

STRUKTUR UND FUNKTION  
CHROMOSOMAL INTEGRIERTER  
HEPATITIS B VIRUS DNA  
AUS HUMANEN HEPATOMZELLEN

Arndt Freytag von Loringhoven

Diss  
München  
1986





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



STRUKTUR UND FUNKTION  
CHROMOSOMAL INTEGRIERTER HEPATITIS B VIRUS DNA  
AUS HUMANEN HEPATOMZELLEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs  
Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Arndt Freytag von Loringhoven  
aus München

München, 1984

1. Berichterstatter: Prof. H. Cleve

2. Berichterstatter: Prof. R. Schweyen

Tag der mündlichen Prüfung: 7. August 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH  
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

## Meinen Eltern

Die Erinnerung an die ersten Jahre meines Lebens ist mir  
so lebendig wie heute. Ich bin so dankbar für die Liebe und  
Fürsorge, die ich von Euch erhalten habe. Ihr seid meine  
Stütze und mein Halt.

Ich liebe Euch so sehr, wie ich Euch liebe. Ihr seid  
meine Eltern und ich bin stolz auf Euch.

Ich bin so dankbar für die Liebe und Fürsorge, die ich  
von Euch erhalten habe. Ihr seid meine Eltern und ich bin  
stolz auf Euch.

Ich bin so dankbar für die Liebe und Fürsorge, die ich  
von Euch erhalten habe. Ihr seid meine Eltern und ich bin  
stolz auf Euch. Ich bin so dankbar für die Liebe und  
Fürsorge, die ich von Euch erhalten habe. Ihr seid meine  
Eltern und ich bin stolz auf Euch.

Ich bin so dankbar für die Liebe und Fürsorge, die ich  
von Euch erhalten habe. Ihr seid meine Eltern und ich bin  
stolz auf Euch. Ich bin so dankbar für die Liebe und  
Fürsorge, die ich von Euch erhalten habe. Ihr seid meine  
Eltern und ich bin stolz auf Euch.

Ich bin so dankbar für die Liebe und Fürsorge, die ich  
von Euch erhalten habe. Ihr seid meine Eltern und ich bin  
stolz auf Euch. Ich bin so dankbar für die Liebe und  
Fürsorge, die ich von Euch erhalten habe. Ihr seid meine  
Eltern und ich bin stolz auf Euch.



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung Virusforschung unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider danke ich für die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Cleve danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Koshy für seine Anteilnahme, Kritik und Diskussionsbereitschaft bedanken. Für viele nützliche Diskussionen bin ich Herrn Dr. O. Marquardt und Herrn Stefan Koch verpflichtet.

Für technische Hilfe danke ich Frau I. Dick, Frau Göhde und Frl. S. Hankel (Gewebekultur), Frau I. Scholz (Elektronenmikroskopie), Frau O. Rösing (Tierpflege) und Frl. E. Piravandi (Plasmidisolierungen).

Herrn Prof. G. Froesner möchte ich für Hilfe mit HBcAg Radioimmunassays danken.



## Inhaltsverzeichnis

|       |                                                                                                   |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A     | ZUSAMMENFASSUNG                                                                                   | 5  |
| B     | EINLEITUNG                                                                                        | 8  |
| 1.    | Aufbau und genetische Organisation des<br>Hepatitis B Virus (HBV)                                 | 9  |
| 2.    | Replikation, Transkription und Translation<br>von HBV                                             | 15 |
| 2.1   | Replikation                                                                                       | 16 |
| 2.2   | Transkription                                                                                     | 17 |
| 2.3   | Translation                                                                                       | 19 |
| 3.    | Mechanismen der HBV Persistenz                                                                    | 21 |
| 3.1   | Unterschiedliche Virustypen                                                                       | 21 |
| 3.2   | Unterschiedliche Wirtsreaktionen                                                                  | 22 |
| 3.3   | Integration viraler DNA                                                                           | 24 |
| 4.    | Ist HBV ein onkogenes Virus?                                                                      | 25 |
| C     | ERGEBNISSE                                                                                        | 31 |
| 1.    | Nachweis chromosomal integrierter HBV<br>Sequenzen in der DNA von humanen<br>Leberkarzinomgeweben | 31 |
| 1.1   | Gewebeproben                                                                                      | 31 |
| 1.2   | Tüpfeltest Analyse                                                                                | 32 |
| 1.3   | Southern Analyse                                                                                  | 35 |
| 1.4   | Zwischenzusammenfassung                                                                           | 39 |
| 2.    | Charakterisierung klonierter integrierter<br>HBV-DNA                                              | 42 |
| 2.1   | Klonierung und Kartierung integrierter<br>HBV-DNA                                                 | 42 |
| 2.1.1 | Klonierung                                                                                        | 43 |

|         |                                                                                          |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.1.2   | Kartierung der Fragmente                                                                 | 51  |
| 2.1.2.1 | Das 6,0 kb Fragment (A-6,0)                                                              | 51  |
| 2.1.2.2 | Deletion(en) in A-6,0                                                                    | 57  |
| 2.1.2.3 | Die Integrationsstelle in A-6,0                                                          | 58  |
| 2.1.2.4 | Das 10,7 kb Fragment (A-10,7)                                                            | 62  |
| 2.1.2.5 | Zwischenzusammenfassung                                                                  | 67  |
| 2.2     | Hybridisierung mit DNA aus nichtinfizierten Zellen                                       | 69  |
| 2.3     | Transformation von NIH 3T3 Zellen                                                        | 72  |
| 2.4     | Translation und Transkription viraler Gene                                               | 75  |
| 2.4.1   | Test auf Expression von HBsAg und HBc/HBeAg                                              | 75  |
| 2.4.2   | Die Zelllinie Ltk 2425                                                                   | 81  |
| 2.4.3   | Eigenschaften des sezernierten HBsAg                                                     | 86  |
| 2.4.4   | Vergleichende Expressionsstudien                                                         | 90  |
| 2.4.4.1 | Vergleich von A-10,7 mit HBV-DNA                                                         | 90  |
| 2.4.4.2 | Kartierung der für die hohe Expression verantwortlichen DNA Region                       | 92  |
| 2.4.4.3 | Test auf Enhanceraktivität                                                               | 99  |
| 2.4.4.4 | Charakterisierung der HBsAg mRNA aus Ltk 2425 Zellen                                     | 103 |
| 2.4.4.5 | Zwischenzusammenfassung                                                                  | 109 |
| 3.      | Induktion des HBcAg-Gens in PLC/PRF/5 Zellen                                             | 110 |
| 3.1     | Diskussion der HBc/HBeAg Expression in PLC/PRF/5 Zellen                                  | 116 |
| D       | DISKUSSION                                                                               | 118 |
| 1.      | Häufigkeit integrierter HBV Sequenzen in der DNA von primären Leberkarzinomzellen        | 118 |
| 2.      | Integrationsmuster von HBV DNA in Zellen aus Biopsiematerial und der PLC/PRF/5 Zelllinie | 120 |

|                         |                                                                      |     |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.                      | Struktur und Funktion klonierter integrierter HBV DNA                | 121 |
| 3.1                     | Intaktheit der HBV Sequenzen                                         | 123 |
| 3.2                     | Lage der Integrationsstellen                                         | 124 |
| 3.3                     | Expression viraler Gene                                              | 126 |
| 4.                      | Bedeutung der HBV Integration für die Entstehung von Leberkarzinomen | 130 |
| E MATERIAL UND METHODEN |                                                                      | 137 |
| 1.                      | Material                                                             | 137 |
| 1.1                     | Verwendete Chemikalien und Enzyme                                    | 137 |
| 1.2.                    | Radiochemikalien                                                     | 139 |
| 1.3.                    | Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide                         | 139 |
| 1.4.                    | Zelllinien                                                           | 140 |
| 1.5.                    | Tumor- und Peritumorgewebe                                           | 141 |
| 1.6.                    | Mäuse                                                                | 142 |
| 1.7.                    | Medien                                                               | 142 |
| 1.8.                    | Sonstiges                                                            | 143 |
| 2.                      | Methoden                                                             | 144 |
| 2.1                     | DNA Isolierung                                                       | 144 |
| 2.1.1                   | Isolierung chromosomaler DNA                                         | 144 |
| 2.1.2                   | Präparative Isolierung von Plasmid DNA                               | 145 |
| 2.1.3                   | Schnellpräparation von Plasmid DNA                                   | 146 |
| 2.1.4                   | Präparative Isolierung von Lambda DNA                                | 146 |
| 2.1.5                   | Schnellpräparation von Lambda DNA                                    | 147 |
| 2.2                     | Verdau mit Restriktionsenzymen                                       | 148 |
| 2.3                     | Agarosegel-Elektrophorese (DNA)                                      | 149 |
| 2.4                     | Elektroelution von DNA Fragmenten                                    | 150 |
| 2.5                     | Nick Translation                                                     | 151 |
| 2.6                     | Hybridisierung mit DNA, immobilisiert auf Nitrozellulose             | 152 |

|       |                                               |     |
|-------|-----------------------------------------------|-----|
| 2.6.1 | Tüpfeltest ("dot blot")                       | 152 |
| 2.6.2 | "Southern blot"                               | 153 |
| 2.6.3 | Plaque Test nach Benton und Davis             | 153 |
| 2.7   | DNA-DNA Hybridisierung                        | 154 |
| 2.8   | Klonierung in Lambda Phagen                   | 155 |
| 2.8.1 | Ligierung                                     | 155 |
| 2.8.2 | Herstellung von Verpackungsextrakten          | 155 |
| 2.8.3 | Verpackung und Plattierung                    | 157 |
| 2.9   | Klonierung in Plasmiden                       | 158 |
| 2.9.1 | Ligierung                                     | 158 |
| 2.9.2 | Transformation von <u>E.coli</u>              | 159 |
| 2.10  | RNA Isolierung                                | 159 |
| 2.11  | Agarosegel-Elektrophorese (RNA)               | 160 |
| 2.12  | "Northern blot"                               | 160 |
| 2.13  | S1 Kartierung                                 | 161 |
| 2.14  | Zellkultur                                    | 162 |
| 2.15  | Transfektion eukaryontischer Zellen           | 162 |
| 2.16  | Radioimmunassay für HBsAg                     | 163 |
| 2.17  | Radioimmunassay für HBeAg                     | 163 |
| 2.18  | ( <sup>35</sup> S)-Markierung von Zellen      | 163 |
| 2.19  | Proteinbestimmung                             | 164 |
| 2.20  | Immunpräzipitation                            | 164 |
| 2.21  | Polyacrylamidgel-Elektrophorese               | 165 |
| 2.22  | Reinigung von HBsAg-Partikeln                 | 166 |
| 2.23  | Elektronenmikroskopie                         | 166 |
| 2.24  | Inokulation von Mäusen                        | 166 |
| 2.25  | CsCl Zentrifugierung des Tumor-<br>homogenats | 167 |
| 2.26  | Sicherheit                                    | 167 |
| F     | LITERATUR                                     | 168 |
| G     | ABKÜRZUNGEN                                   | 187 |
| H     | LEBENS LAUF                                   | 188 |

## A. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund epidemiologischer Daten gilt heute eine kausale Rolle des Hepatitis B Virus (HBV) in der Entstehung von primären Leberkarzinomen (PLC) beim Menschen als sehr wahrscheinlich. In der DNA vieler Leberkarzinomzellen sind HBV Sequenzen chromosomal integriert. Um weitere Hinweise auf einen Kausalzusammenhang zwischen HBV und PLC sowie auf einen Wirkungsmechanismus der Onkogenese zu erhalten, wurde eine detaillierte Analyse integrierter HBV DNA und flankierender humaner Sequenzen durchgeführt.

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde die Häufigkeit integrierter HBV Sequenzen in der DNA von Zellen aus Leberkarzinomen sowie nichtmalignen Leberbereichen (Peritumor) untersucht. Die DNA aus vier von neun Tumorzellproben und eine von elf Peritumorproben enthielt integrierte HBV Sequenzen. Die Integrationsmuster ergaben keine Anzeichen für gleiche Integrationsstellen in der DNA verschiedener Tumorzellen. Es gab Hinweise für "head to tail" tandemartige Integrate von HBV DNA.

Im zweiten Teil wurden aus der DNA der PLC Zelllinie PLC/PRF/5 durch molekulare Klonierung zwei Fragmente (A-6,0 und A-10,7) isoliert, die integrierte HBV DNA sowie flankierende humane Sequenzen enthalten. Die Charakterisierung dieser Fragmente bildet den zentralen Teil dieser Dissertation.

A-6,0 enthält HBV DNA, die auf beiden Seiten von humaner DNA flankiert ist. Ca. 450 bp des HBV Genoms (zwischen dem HBcAg- und HBsAg-Gen) sind deletiert. A-10,7 besitzt nur

einen Teil der integrierten viralen DNA und nur an einer Seite flankierende humane DNA. Die vorhandenen viralen Sequenzen sind aufgrund der Restriktionskarten kollinear mit der genomischen viralen DNA. In beiden Inserts liegt die virale Integrationsstelle in einer Region ("Gap"), die in der unintegrierten viralen DNA einzelsträngig ist. Die Restriktionskarten der humanen Sequenzanteile beider Inserts sind verschieden. Die Integration in A-6,0 ist mit einer Deletion von 1,05 kb humaner Sequenzen verbunden.

A-6,0 besitzt kein funktionsfähiges HBsAg- oder HBcAg-Gen. A-10,7 hingegen enthält ein intaktes HBsAg-Gen, da mit A-10,7 transfizierte Maus Ltk Zellen HBsAg sezernieren. Die HBsAg Expression von A-10,7 ist überraschenderweise wesentlich höher als von viraler HBV DNA. Als molekulare Grundlage konnte die Anwesenheit einer Enhancersequenz in der humanen DNA experimentell ausgeschlossen werden. Die durch A-10,7 transkribierte HBsAg mRNA trägt jedoch ca. 440 bp humaner Sequenzen, die durch eine Zunahme intramolekularer Basenpaarung zu einer größeren Stabilität der mRNA und somit zu der erhöhten HBsAg Expression führen könnten.

In beiden Fragmenten konnten keine onkogenen Eigenschaften nachgewiesen werden, da sie weder NIH 3T3 Zellen transformieren noch Sequenzen von neun bekannten Onkogenen enthalten. Durch die Ergebnisse der Struktur- und Funktionsanalyse konnten aber Modellvorstellungen für mögliche onkogene Wirkungsmechanismen von HBV entwickelt werden, die im Text ausführlich diskutiert sind:

- 1) Durch die erhebliche Deletion (1,05 kb) in der Human DNA an der A-6,0 Integrationsstelle wurde möglicherweise ein Wirts-Gen inaktiviert, welches in funktionellem Zustand die maligne Zelltransformation unterdrückt.
- 2) Die humanen Sequenzen auf der effizient transkribierten A-10,7 HBsAg mRNA könnten zu Translationsprodukten führen,

die Zellen maligne transformieren.

Im dritten Teil dieser Dissertation konnte eine Induktion des HBcAg-Gens in PLC/PRF/5 Zellen durch Zucht in nu/nu Mäusen gezeigt werden. Als molekularer Mechanismus ist in erster Linie eine Demethylierung des HBcAg-Gens in Betracht zu ziehen.

## B. EINLEITUNG

Hepatitis, eine Entzündung der Leber, ist - weltweit gesehen - eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten. Meist wird sie durch die hepatotropen Viren, nämlich Hepatitis A Virus (HAV), Hepatitis B Virus (HBV) oder non-A, non-B Viren ausgelöst. Aber auch andere Viren (z.B. Cocksackie-Virus, Herpesviren), Chemikalien (Alkohol, Medikamente) und Strahlen können eine Hepatitis hervorrufen (Eisenburg, 1982). Medizinisch gesehen ist die durch HBV verursachte "B-Hepatitis" ein besonders gravierendes Problem, einmal wegen ihrer außerordentlich weiten Verbreitung, aber auch wegen der Gefahr der Viruspersistenz im Organismus und der damit verbundenen möglichen Ausbildung einer Lebercirrhose und/oder eines primären Leberkarzinoms.

In der Regel (>90%) verläuft eine HBV Infektion allerdings akut, meist sogar subklinisch, d. h. ohne ausgeprägte Krankheitssymptome. Klinisch manifeste akute Infektionen führen nach einer ein- bis zweimonatigen Inkubationszeit zu einer schweren Leberentzündung, die nach einigen weiteren Monaten wieder abklingt. In seltenen Fällen (0,5 - 5%) ist die Infektion fulminant und endet, wenn unbehandelt, sehr häufig mit dem raschen Tod des Patienten.

Etwa 5 - 10% der akut an Hepatitis B Erkrankten werden zu chronischen Trägern von HBsAg. Bei diesen Personen - weltweit ca. 200 Millionen - ist das virale Oberflächenprotein HBsAg über längere Zeit, oft über Jahrzehnte, im Serum nachweisbar. Ein kleiner Teil der chronisch Infizierten zeigt keine Anzeichen von Leberentzündung, die sogenannten "gesunden" chronischen Virusträger. Bei einem großen Teil

der Träger besteht aber gleichzeitig auch eine chronische Hepatitis, die in zwei morphologisch definierbare Formen unterteilt wird: die chronisch - persistierende und die chronisch - aggressive Hepatitis. Die Gefahr bei letzterer liegt in dem sehr häufigen Übergang zu Lebercirrhose und/oder -karzinom. Da zwischen dem primären Leberkarzinom beim Menschen - einer der häufigsten zum Tod führenden Krebsarten überhaupt - und HBV ein klarer epidemiologischer Zusammenhang besteht, erhebt sich die Frage, ob HBV onkogene Eigenschaften hat.

## 1. AUFBAU UND GENETISCHE ORGANISATION DES HEPATITIS B VIRUS

Die Erforschung des Virus, das eine solche Vielfalt von Krankheitsbildern auslöst, begann mit der Entdeckung des sogenannten Australia-Antigens durch Blumberg et al. (1965) und der Entdeckung des Zusammenhanges zwischen diesem Antigen und der Virus B-Hepatitis beim Menschen (Prince, 1968). Seither haben vor allem elektronenmikroskopische, immunologische und molekularbiologische Untersuchungen zu einer Charakterisierung des Erregers beigetragen.

Das Serum von Hepatitis B Patienten enthält drei HBV-spezifische Partikel: am häufigsten sind kugel- oder stabförmige 22 nm Partikel (Dane et al., 1970), welche leere Virushüllen darstellen, die im Überschuß gebildet werden. Wesentlich seltener sind die 42 nm großen kugelförmigen Dane-Partikel (Dane et al., 1970), welche nach aller Wahrscheinlichkeit die eigentlichen infektiösen Virionen darstellen. Dane-Partikel bestehen aus einer äußeren Hülle, die das Oberflächenprotein HBsAg ("surface"-Antigen, das frühere Australia Antigen) enthält, und einem Kern (Nukleokapsid), der das Kernprotein HBcAg ("core"-Antigen), eine DNA-Polymerase, eine Phosphorylkinase sowie eine zirkuläre, teilweise doppelsträngige DNA nebst einem

kovalent gebundenen Protein enthält (Tiollais et al., 1981, Übersichtsartikel). Immunologische Marker von HBV sind die Antigene HBsAg, HBcAg und HBeAg und deren Antikörper.

Die Virushülle besteht neben HBsAg aus verschiedenen Lipiden, Kohlehydraten und Proteinen (Gerin & Shih, 1978), die vermutlich größtenteils aus der Wirtszelle stammen. Das viruskodierte HBsAg besitzt eine antigene Determinante a und zwei von vier Subtyperdeterminanten, nämlich d oder y bzw. w oder r (Tiollais et al., 1981). Es gibt also die Subtypen adw, ayw, adr und ayr. Biochemisch ist das HBsAg als P1 und P2 beschrieben (Gerin & Shih, 1978), die sich nur dadurch unterscheiden, daß P2 glykosyliert ist. Die gesamte Aminosäuresequenz von P1 ist durch die Nukleotidsequenz des entsprechenden, viralen S-Gens bekannt. Amino- und carboxyterminale Enden sind auch direkt sequenziert worden (Peterson et al., 1968). Das Protein enthält hydrophile Regionen, die vermutlich für die Antigenität verantwortlich sind und hydrophobe Regionen, welche es möglicherweise in der Zellmembran verankern. P1 hat ein Molekulargewicht von 25400 d und P2 von ca. 29000 d (Tiollais et al., 1981). Beide kommen in etwa gleichen Mengen vor und zwar wahrscheinlich als Dimere (Skelly et al., 1978), die durch Disulfidbrücken verbunden sind. (Mishiro et al., 1980).

Das Nukleokapsid enthält als häufigstes Protein das sogenannte "P19" Protein (Molekulargewicht=19000 d), welches immunologisch als HBcAg bekannt ist. Die Aminosäuresequenz ist durch Ableitung von der Nukleinsäuresequenz des korrespondierenden C-Gens bekannt. Die C-terminalen 40 Aminosäuren sind durch ihren hohen Arginingehalt stark basisch (Nakano et al., 1976) und binden vermutlich an die HBV-DNA. Eine im Kern befindliche Proteinkinase (Molekulargewicht=19700 d) kann das HBcAg phosphorylieren (Albin & Robinson, 1980). HBcAg wurde durch Immunfluoreszenz vorwiegend in den Kernen von infizierten Hepatozyten

nachgewiesen (Barker et al., 1973). Das hauptsächlich im Serum von Hepatitis B Patienten vorkommende HBeAg ist ein Spaltprodukt von HBcAg: Beide Proteine werden durch dasselbe Gen (Gen C) kodiert, und HBcAg kann durch Proteolyse oder SDS-Denaturierung in HBeAg umgewandelt werden (Mackay et al., 1981a). Es ist nicht klar, ob HBeAg eine biologische Funktion hat oder nur ein Abbauprodukt von HBcAg darstellt.

Zwei weitere Proteine sind im Nukleokapsid lokalisiert: 1) eine HBV-DNA Polymerase (Molekulargewicht unbekannt; Robinson et al., 1982), die das 3'-Ende des S-Stranges der HBV-DNA (siehe unten) in vitro verlängern kann (Summers et al., 1975). Es ist daher anzunehmen, daß sie in vivo eine Rolle in der HBV Replikation spielt (Summers & Mason, 1982). 2) Am 5'-Ende des viralen L-Stranges (siehe unten) befindet sich ein kovalent gebundenes Protein (Molekulargewicht unbekannt; Gerlich & Robinson, 1980), welches als Primer für Nukleinsäuresynthese agieren könnte (Summers & Mason, 1982).

Die genetische Information des HBV ist in etwa 3200 Basenpaaren (bp) niedergelegt. Die HBV-DNA hat eine außergewöhnliche Struktur: sie ist ein teilweise doppelsträngiges, zirkuläres Molekül, welches einen Strangbruch ("Nick") im langen Strang (L-Strang) und eine unterschiedlich lange Lücke ("Gap") im kurzen Strang (S-Strang) aufweist (Abb. 1). Die Positionen der 5'-Enden der beiden Stränge sind sehr wenig variabel und ca. 200 bp voneinander entfernt (Deliuss et al., 1983). Das 3'-Ende des S-Stranges kann dagegen an sehr unterschiedlichen Positionen liegen, wodurch der Anteil einzelsträngiger DNA zwischen 0% und 40% schwanken kann. Die Bedeutung der "Nick-Gap" Struktur ist unklar. Es wurde für den "Nick-Gap" Zwischenraum eine Rolle in der Integration der HBV-DNA in chromosomale Wirts-DNA postuliert (Gray et al., 1980): durch Denaturierung der DNA-Stränge zwischen "Nick" und "Gap" könnten ca. 200 bp lange terminal redundante Sequenzen

entstehen, welche, ähnlich wie bei retroviralen "long terminal repeats", zu einem spezifischen Integrationsmechanismus führen könnten. Eine Überprüfung dieser Hypothese wurde durch die in dieser Dissertation vorgestellte Analyse der Organisation chromosomal integrierter HBV-DNA möglich.

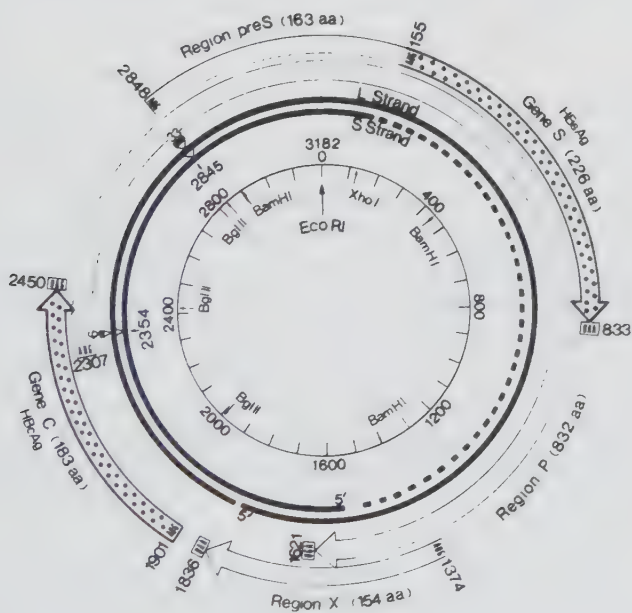
#### Abb. 1

Genetisches Programm des Hepatitis B Virus (Seite 13).

Die dicke schwarze Linie repräsentiert die HBV-DNA; die gestrichelte Linie zeigt die variable einzelsträngige Region. Der Abstand der 5' Enden der L- und S-Stränge beträgt nach neueren Daten nur ca. 200 bp (Delius et al., 1983). Durch Pfeile sind die Positionen einiger Restriktionsstellen der ayw HBV-DNA gekennzeichnet (Galibert et al., 1979). Zwei zusätzliche Sequenzen von 6 und 33 Nukleotiden an Position 2354 und 2845 sind in adw HBV-DNA enthalten (Valenzuela et al., 1980). Die breiten, offenen Pfeile zeigen die Positionen der in allen HBV Genomen konservierten Leserahmen S, C, X und P an. Die Längen (Anzahl der Aminosäuren, aa) der durch die Nukleotidsequenz bestimmten Polypeptide sind in Klammern angegeben. Die zwei Regionen, welche den definierten Genen S und C entsprechen, sind gepunktet. (Übernommen von Tiollais et al., 1981)

Abb. 1

# GENETISCHES PROGRAMM DES HEPATITIS B VIRUS



5 verschiedene HBV-Genome der Subtypen adw (Valenzuela et al., 1980; Ono et al., 1983), adr (Fujiyama et al., 1983; Ono et al., 1983), ayw (Galibert et al., 1979), sind vollständig und eines des Subtyps adyw (Pasek et al., 1979) ist teilweise sequenziert worden. Trotz erheblichen Unterschieden zwischen den Restriktionskarten und Nukleotidsequenzen befinden sich in allen sechs HBV Genomen auf dem L-Strang vier lange, offene Leserahmen (S, C, P und X, siehe Abb. 1). Zwei von diesen (S und C) kodieren sicher für Proteine; bei den zwei anderen (P und X) ist dies bisher noch unklar. Das S-Gen (Nukleotid 155 bis 883) kodiert für P1, bzw. P2 (HBsAg). Dies ist aus der Übereinstimmung der sequenzierten amino- und carboxyterminalen Aminosäuresequenzen von P1 mit der Nukleotidsequenz des S-Gens bekannt. Das C-Gen (Nukleotid 1901 bis 2450) kodiert für "P19" (HBcAg): ein DNA-Fragment, welches nur diese Region beinhaltet, führte in E.coli zu Expression von HBcAg (Burrell et al., 1979). Die P-Region ist 2495 Nukleotide lang (Position 2307 bis 1620) und könnte für die HBV-DNA Polymerase kodieren, aber bisher konnte weder eine Transkription noch eine Translation der P-Region gezeigt werden. Die X-Region (Nukleotid 1374 bis 1835) wird transkribiert (Gough, 1982). Ob sie auch translatiert werden kann, was zu einem bisher unbekannten basischen Protein führen würde, ist jedoch noch nicht bekannt.

Auch auf den S-Strängen der sechs sequenzierten HBV Genome gibt es kurze offene Leserahmen. Da deren Positionen aber stark variieren, wurde bisher angenommen, daß diese Leserahmen nicht zu Genprodukten führen (Tiollais et al., 1981). Überraschenderweise gelang jedoch kürzlich die in vitro Transkription eines dieser S-Strang Leserahmen durch RNA Polymerase III ("700 bp Transkript", Standing et al., 1983). Ob dieses Transkript aber auch in vivo existiert und ob es translatiert wird, ist bisher nicht bekannt.

## 2. REPLIKATION, TRANSKRIPTION UND TRANSLATION VON HBV

Eines der großen Probleme der Hepatitis B Forschung ist, daß bisher kein in vitro System zur Replikation von HBV existiert. Bis vor kurzem wurde angenommen, daß HBV in vivo nur Menschen- und Schimpansenhepatozyten infiziert. Alle Versuche, aus primären, nichtmalignen, humanen Hepatozytenkulturen permanente Zelllinien zu etablieren, sind fehlgeschlagen; in den wenigen, aus humanen Hepatomen stammenden, Hepatozytenzelllinien kann sich HBV nicht vermehren.

In letzter Zeit wurde HBV-DNA jedoch auch in anderen Zellen nachgewiesen, nämlich im Knochenmark (Romet-Lemanne et al., 1983), in Kaposi Sarkomen (Siddiqui, 1983), im Gallentrakt und im Muskel (Blum et al., 1983) sowie, beim eng verwandten "duck hepatitis virus" (DHBV), in Pankreas- und Nierenzellen (Halpern et al., 1983). Da also neben Hepatozyten auch andere Zelltypen als Wirt für HBV in Frage kommen, darf man hoffen, daß in nicht allzuferner Zukunft ein Zellkultursystem für HBV etabliert wird.

Obgleich die Vermehrung von HBV also bis jetzt nicht in vitro untersucht werden kann, konnten in den letzten Jahren wichtige Ergebnisse über Replikation, Transkription und Translation zusammengetragen werden. Unser derzeitiges Wissen stammt vor allem

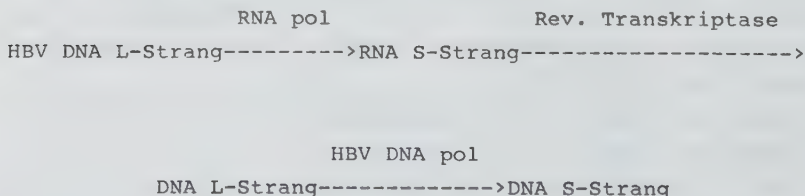
- 1) aus der Analyse von in vivo infizierten Menschen- und Schimpansenlebern,
- 2) aus Untersuchungen an eng verwandten Viren: zu diesen zählt das "woodchuck hepatitis virus" (WHV), das "duck hepatitis B virus" (DHBV) und das "ground squirrel hepatitis virus" (GSHV), welche alle wie HBV zur Klasse der Hepadnaviren zählen,
- 3) aus Untersuchungen an Zelllinien, die chromosomal integrierte HBV-DNA enthalten. Einige dieser Zelllinien

stammen aus humanen Hepatomen (Alexander et al., 1976; Das et al., 1980; Knowles et al., 1980) , also aus natürlichen Infektionen, andere entstanden in vitro durch die Einschleusung von HBV-DNA in Zellen, in denen sich HBV nicht vermehren kann (siehe unten).

Einige der Informationen über Replikation, Transkription und Translation von HBV stammen also aus artifiziellen Systemen oder von anderen Viren. Ob diese Erkenntnisse auch für die Vermehrung von HBV in humanen Hepatozyten gelten, ist zwar wahrscheinlich, aber meist noch nicht bewiesen.

## 2.1 Replikation

Für eine Sensation sorgte die Entdeckung von Summers & Mason (1982), daß bei dem "duck hepatitis B virus" (DHBV) eine Reverse Transkriptase in der Replikation eine Rolle spielt. Nach ihrem für alle Hepadnaviren vorgeschlagenen Modell wird erst eine RNA Kopie des L-Stranges synthetisiert, die dann von einer Reversen Transkriptase in einen neuen L-Strang umgeschrieben wird; die Hepadnavirus DNA Polymerase füllt den S-Strang auf:



Zwar konnte keine Reverse-Transkriptase Aktivität für die endogene DHBV-DNA Polymerase gezeigt werden (Mason et al., 1982), aber eine Nukleotidsequenzverwandschaft des HBV P-Gens, welches für die HBV-DNA Polymerase kodieren könnte, mit dem Reversen-Transkriptase Gen des Rous Sarkom Virus (Hiroyuki et al., 1983) weist doch auf eine solche Aktivität hin. Wegen der starken Ähnlichkeit von DHBV und HBV (Mason et al., 1982) ist höchstwahrscheinlich auch bei HBV eine Reverse Transkriptase bei der Replikation beteiligt, die allerdings noch nicht nachgewiesen werden konnte.

## 2.2 Transkription

Die Transkription von HBV Genen wurde hauptsächlich in Zelllinien (vergl. Seite 16, oben) untersucht, die chromosomal integrierte HBV-DNA enthalten. Man sollte dabei beachten, daß der integrierte, lineare Zustand der sonst zirkulären DNA zu anomalen Transkriptionsprodukten führen kann. Daher müssen die so nachgewiesenen mRNAs nicht unbedingt den während einer Infektion transkribierten mRNAs entsprechen. Zudem ist integrierte DNA vieler Viren (z.B. SV40, Adenovirus, woodchuck hepatitis virus) häufig durch Rearrangements gekennzeichnet, was zu aberranten Transkriptionsprodukten führen kann.

Die HBsAg mRNA wurde von Cattaneo et al. (1983b) mittels "S1 Kartierung" und "Primer Extension" genau charakterisiert. Sie untersuchten (1.) mRNA aus einer infizierten Schimpansenleber, (2.) aus Rattenzellen, die integrierte HBV-DNA enthielten und (3.) in vitro transkribierte mRNA. In allen Fällen gelangten die Autoren zu den gleichen Ergebnissen: die HBsAg mRNA ist 2,1 kb lang und nicht "gesplitt". Also enthält das S-Gen keine Introns. Das 5' Ende der mRNA liegt 185 bp vor dem S-Gen. Obwohl TATA Sequenzen, welche fast ausnahmslos den Promotor für

eukaryontische mRNA Transkription darstellen, vor der preS Region (Nukleotid 2848-154) vorhanden sind, beginnt die HBsAg mRNA in der preS Region und verwendet keine TATA Sequenz. Die HBsAg Promotorregion weist aber starke Sequenzähnlichkeit mit der "SV40-late" Promotorsequenz auf.

Es gibt aber auch Hinweise für die Transkription und Translation von preS Sequenzen, die 5'-wärts des SV40-ähnlichen Promotors liegen. Stibbe & Gerlich (1982) konnten zeigen, daß in Dane Partikeln, nicht aber in den wesentlich häufigeren 22 nm Partikeln, neben HBsAg größere Polypeptide enthalten sind, welche zusammenhängende Translationsprodukte des gesamten preS- und des S-Gens darstellen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis steht der Nachweis transkribierter vollständiger preS Sequenzen durch einige Arbeitsgruppen (Gough & Murray, 1982; Pourcel et al., 1982a; Rall et al., 1983). Zusammenfassend kann man davon ausgehen, daß die HBsAg mRNA vorwiegend von dem SV40-ähnlichen Promotor, ein weit geringerer Anteil aber auch von der dem preS Gen vorgelagerten TATA-Sequenz transkribiert wird.

In den bereits zitierten Untersuchungen der HBsAg mRNA wurde auch deren 3'Ende kartiert. Alle Arbeitsgruppen waren sich darin einig, daß sich die Polyadenylierungssequenz des S-Gens 1083 bp hinter dem Translationsstopkodon befindet (im C-Gen), wodurch die HBsAg mRNA um mehr als 1000 zusätzliche Nukleotide verlängert wird.

HBcAg mRNA wurde von Gough (1983) in Maus- und Rattenzellen untersucht, die tandemartig integrierte HBV Genome (mehrere Kopien in gleicher Orientierung hintereinander) enthalten und HBcAg exprimieren. Die einzige RNA in "Northern blots", die mit HBcAg-Gen-spezifischen DNA Proben hybridisierte, war 4,0 kb lang, also länger als das HBV Genom. Ob dieses Transkript aber auch in infizierten Hepatozyten vorkommt, ist bisher nicht bekannt. Ferner wurde

in den gleichen Zellen eine 1,05 kb lange mRNA gefunden, die ausschließlich mit X-Gen-spezifischen DNA Sequenzen hybridisierte. Ein Transkriptionsprodukt des P-Gens konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden.

### 2.3 Translation

Durch in vitro Einschleusung klonierter HBsAg Gene in prokaryontische oder eukaryontische Zellen konnte die Expression von HBsAg in zahlreichen Systemen erzielt und charakterisiert werden: in E.coli (MacKay et al., 1981b), Saccharomyces cerevisiae (Valenzuela et al., 1982; Miyano-hara et al., 1983) und in Animalzelllinien wie Maus L-Zellen (Pourcel et al., 1982b), Maus NIH 3T3 Zellen (Christman et al., 1982; Stratowa et al., 1982; Wang et al., 1983b), Rattenfibroblasten (Gough & Murray, 1982), Affennierenzellen (Moriarty et al., 1981), Vero Zellen (Colbere-Garapin et al., 1983), COS Zellen (Cattaneo et al., 1983a) und HeLa Zellen (Hirschmann et al., 1980). Außerdem sezernieren einige der HBV-DNA enthaltenden Hepatomzelllinien HBsAg (Macnab et al., 1976; Aden et al., 1979; Das et al., 1980). In allen beschriebenen Animal- und Hefezellen, nicht aber in Bakterien wurden dabei 22 nm Partikel (Hüllprotein) beobachtet, wie sie aus infiziertem humanem Serum bekannt sind. Eine Glykosylierung von HBsAg erfolgt nur in Animalzellen.

Viele der erwähnten in vitro Systeme zur HBsAg Expression wurden vor allem etabliert, um eine sichere und billige Vakzine gegen Hepatitis B zu entwickeln. Einige der Produkte stehen in oder kurz vor der klinischen Erprobung und werden vielleicht bald eine Alternative zu dem teuren, aus dem Serum von HBsAg Trägern hergestellten, Impfstoff bieten.

HBcAg-, aber nicht HBeAg-Expression ist in E.coli erzielt worden (Burrell et al., 1979; Edman et al., 1981). Es

konnten auch 27 nm Partikel gezeigt werden, welche der Größe von Nukleokapsiden entsprechen (Cohen & Richmond, 1982). Die Zusammensetzung solcher E.coli Partikel wurde nicht näher untersucht. Sie ist aber sicherlich völlig anders als die von Nukleokapsiden, da in E.coli viele der Komponenten der Nukleokapside (vollständige HBV-DNA, Polymerase, kovalent gebundenes Protein) fehlen. Nur in wenigen Animalzellen, die mit HBV-DNA transfiziert worden waren, gelang die Expression von HBc/HBeAg (Gough & Murray, 1982; Acs et al., 1983). Sie war allerdings wesentlich niedriger als die von HBsAg, was an die Überproduktion von Virushüllen in infizierten Hepatozyten erinnert. Vermutlich ist daher der C-Gen Promotor weit weniger effizient als der S-Gen Promotor. Bisher konnte für keine der Hepatomzelllinien HBcAg oder HBeAg Expression gezeigt werden. Ein Proteinprodukt des P- oder X-Gens hat man noch nicht nachweisen können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß es trotz des bisher fehlenden in vitro Systems zur Vermehrung von HBV gelungen ist, wichtige Informationen über Replikation, Transkription und Translation von HBV zu erhalten. Es ist aber bei einigen dieser Ergebnisse fraglich, ob sie auch für akut mit HBV infizierte Hepatozyten gelten. Dies gilt insbesondere für die Transkription, die größtenteils in artifiziellen Systemen (chromosomal integrierte HBV-DNA oder in vitro Transkription) untersucht wurde. Ob z.B. die HBcAg mRNA auch in akut infizierten Hepatozyten länger als das HBV Genom ist und ob ein X-Gen Produkt oder die "700 bp RNA" des S-Stranges existieren, ist zweifelhaft. Dagegen treffen andere indirekte Schlußfolgerungen über die Vermehrung von HBV höchstwahrscheinlich zu, so z.B. die Rolle einer Reversen Transkriptase in der Replikation (aufgrund der sehr engen Verwandtschaft zwischen HBV und DHBV).

### 3. MECHANISMEN DER HBV-PERSISTENZ

Noch ist weitgehend unklar, auf welche Weise HBV die anfangs geschilderten verschiedenen Formen akuter (fulminant oder nicht fulminant) und persistenter (chronisch-persistierend oder chronisch-aggressiv) Infektion verursacht. Es könnten dabei unterschiedliche HBV-Typen, verschiedene Reaktionen des Wirts auf eine Infektion, oder beides eine Rolle spielen.

#### 3.1 Unterschiedliche Virustypen

Über die Möglichkeit, daß Unterschiede in der Zusammensetzung von HBV - in der DNA Struktur oder Nukleotidsequenz - zu unterschiedlichen Infektionsformen führen, ist bisher nur spekuliert worden; es gibt hierfür keine konkreten Hinweise. Es wäre z. B. denkbar, daß durch Punktmutationen hochvirulente Viren entstehen, welche zu fulminanter Hepatitis führen (Eisenburg, 1982). Die Identifikation der relevanten Basenaustausche wäre aber äußerst schwierig, da HBV Nukleotidsequenzen einen hohen Grad an Polymorphismus aufweisen. Nicht auf Sequenzunterschiede, sondern auf die Struktur der HBV-DNA bezieht sich hingegen eine Hypothese von Ruiz-Opazo et al. (1982) zur Erklärung der Persistenz: die von ihnen in chronisch persistent infizierten Schimpansen in geringen Mengen (<1%) nachgewiesenen Dane Partikel mit kovalent geschlossener HBV-DNA könnten die eigentlichen infektiösen Viren sein. Dane Partikel mit HBV-DNA der weiter oben beschriebenen "Nick-Gap" Struktur (>99%) wären defektive Viren und für die Persistenz verantwortlich. Dieser interessante Denkanstoß läßt sich aber nur überprüfen, wenn es gelingt, in vitro Modellsysteme für eine akute und persistente HBV Infektion zu etablieren.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die erwähnten S-Strang Leserahmen, welche in verschiedenen HBV Genomen an unterschiedlichen Positionen liegen, zu stammspezifischen Transkriptions- und/oder Translationsprodukten führen. So könnten Infektionen mit verschiedenen HBV Stämmen unterschiedliche biologische und vielleicht auch medizinische Konsequenzen haben. Die Transkription eines solchen S-Strang Leserahmens wurde aber, wie bereits erwähnt, bisher nur in vitro gezeigt (Standing et al., 1983).

Alle in diesem Abschnitt diskutierten Hypothesen sind rein spekulativer Natur. Aufgrund der erheblichen Unterschiede zwischen HBV Stämmen (Polymorphismus der Nukleotidsequenz, verschiedene S-Strang Leserahmen) sollten diese Denkansätze jedoch nicht vernachlässigt, sondern überprüft werden, sobald dafür experimentelle Systeme zur Verfügung stehen.

### 3.2 Unterschiedliche Wirtsreaktionen

Während es also noch weitgehend unklar ist, ob unterschiedliche Virustypen auf den Verlauf der Infektion einen entscheidenden Einfluß ausüben, ist sicher, daß Individuen verschieden auf eine HBV Infektion reagieren. Auf alle Fälle spielen genetische Faktoren eine Rolle. So entstehen z. B. primäre Leberkarzinome häufiger bei männlichen als bei weiblichen HBsAg Trägern; Asiaten entwickeln öfter als andere Rassen primäre Leberkarzinome.

Wie es zur Persistenz von HBV kommen kann, ist bisher ungeklärt. Der folgende Erklärungsversuch ist zwar in einigen Teilen hypothetisch, steht aber mit den bisher veröffentlichten Daten in Übereinstimmung. Kernpunkt dieser Hypothese ist die Annahme eines noch nicht direkt bewiesenen

Immundefekts, aufgrund dessen die vollständige Eliminierung infizierter Zellen ausbleibt (Meyer zum Büschfelde et al., 1980; Popper et al., 1982).

Vermutlich werden infizierte Hepatozyten nicht durch die Viren selbst lysiert. Dies läßt sich z.B. aus dem Befund schließen, daß chronische Hepatitis B Patienten unter Immunsuppressionstherapie trotz hoher Virustiter nur geringe Leberschäden zeigen (R. Müller, pers. Mitteilung). Es wird deshalb angenommen, daß die Zellyse nicht direkt durch die Infektion, sondern indirekt durch T-Zellen erfolgt (Thomas et al., 1982), welche HBcAg erkennen, das außer im Zellkern in geringer Konzentration auch auf der Hepatozytenmembran vorhanden ist (Eddleston et al., 1982; Thomas et al., 1982; Trevisan et al., 1982). Würde nun im Einzelfall die Erkennung HBcAg tragender Zellen durch T-Zellen suboptimal erfolgen, könnten HBV-enhaltende Zellen nicht mehr vollständig eliminiert und die Virusvermehrung nicht mehr von der Immunabwehr eingeholt werden. So entstünde eine persistente Infektion.

Eine defekte Immunreaktion auf eine HBV Infektion muß nicht unbedingt eine allgemein defekte zelluläre Immunität bedeuten: T-Zellrezeptoren erkennen nicht nur ein Virusantigen allein, sondern in physischer Verbindung mit HLA Glykoproteinen (Golub, 1980; Thomas et al., 1982), deren Dichte und Typ höchstwahrscheinlich bei der Immunabwehr einer HBV Infektion, wie auch bei anderen Infektionen, von entscheidender Bedeutung sind. Diese Proteine sind auf gesunden und chronisch infizierten Leberzellen spärlich vorhanden, sind jedoch häufig bei Patienten, die eine HBV Infektion erfolgreich abgewehrt haben (Montano et al., 1982). Möglicherweise werden HLA-Proteine während einer HBV Infektion amplifiziert, und dieser Mechanismus ist bei Patienten mit chronischer Hepatitis defekt. Ferner wurden bei chronisch Infizierten charakteristische HLA Phänotypen

beschrieben (Mazzilli et al., 1977). Auf molekularer Ebene könnte der Defekt im HLA-System darin bestehen, daß sich HLA-Antigene schlecht mit HBcAg verbinden.

Zusammenfassend könnten genetische Defekte im HLA System (in der Sequenz der HLA Gene oder in der Fähigkeit zur Amplifikation bestimmter HLA Proteine) zu mangelhafter HBcAg Erkennung durch T-Zellen, damit zu unzureichender Beseitigung von HBV-infizierten Hepatozyten und so zur Persistenz von HBV führen. Diese Erklärung steht in Übereinstimmung mit den bisher veröffentlichten Daten, aber viele Beweise stehen noch aus (z.B. für die Hepatozytenlyse durch T-Zellen, für die Rolle von HBcAg in der Erkennung infizierter Hepatozyten durch T-Zellen, oder für eine Rolle von HLA Proteinen).

### 3.3 Integration viraler DNA

Eine Konsequenz chronischer HBV Vermehrung in der Leber ist die häufige Integration von HBV-DNA in das Hepatozyten-genom. In späten Stadien chronischer Hepatitis wurde nicht nur episomale, sondern auch integrierte HBV-DNA nachgewiesen. Somit kann HBV nicht nur durch Replikation, sondern auch durch chromosomale Integration seiner DNA in Hepatozyten persistieren.

London und Blumberg (1982) haben ein Modell vorgeschlagen, nach dem es in der Leber für HBV Replikation permissive (S) und nichtpermissive (R) Zellen gibt. HBV-DNA könnte in beiden Zelltypen chromosomal integriert werden (aus vielen Transfektionsversuchen an Zellen in Kultur ist bekannt, daß jegliche DNA leicht durch nicht-homologe Rekombination in chromosomale DNA integriert werden kann). Da HBcAg-exprimierende Zellen in der Leber auf die Dauer zerstört werden, würden virusproduzierende S-Zellen und HBcAg-exprimierende

R-Zellen durch T-Lymphozyten lysiert. Aber R-Zellen, die integrierte HBV-DNA enthalten und kein HBcAg exprimieren, würden im Zuge der Hepatozytenlyse und -regeneration selektioniert. Für diese Hypothese spricht, daß in Cirrhose- und in Karzinomgeweben Zellklone mit integrierter HBV-DNA entdeckt wurden (Brecht et al., 1981; Koshy et al., 1981) und in Hepatomgeweben sowie -zelllinien nie HBcAg nachgewiesen werden konnte (Brecht et al., 1981; Gerin et al., 1982).

#### 4. IST HBV EIN ONKOGENES VIRUS ?

Nach langjähriger chronischer Hepatitis B kommt es häufig zur Ausbildung eines primären Leberkarzinoms (PLC). Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine kausale Rolle von HBV in der PLC-Entstehung zuerst von Payet et al. (1956) und Steiner et al. (1957) vorgeschlagen. Heute gibt es hierfür eine Reihe starker Hinweise, die sich allerdings nur auf Korrelationen von HBV mit PLC stützen (siehe unten). Ein kausaler Zusammenhang wäre bewiesen, wenn infolge weitreichender HBV Impfprogramme die Inzidenz des primären Leberkarzinoms drastisch abnähme. Eine andere Beweismöglichkeit wäre durch die maligne Transformation von Hepatozyten in Zellkultur als Folge der Einschleusung von HBV DNA gegeben, sobald etablierte, nichtmaligne Hepatozyten-Zelllinien zur Verfügung stehen. Bis dahin kann eine onkogene Potenz von HBV als wahrscheinlich, aber nicht sicher gelten. Für eine Rolle von HBV in der PLC Entstehung sprechen:

- Eine ausgezeichnete weltweite Korrelation der geographischen Verbreitung von PLC und HBsAg (Szmunness, 1978). Aber auch andere Agenzien korrelieren mit PLC. Insbesondere Mykotoxine (z.B. Aflatoxin) und Alkohol scheinen auch, vielleicht zusammen mit HBV, an der Ätiologie von PLC beteiligt zu sein.
- Seren von PLC-Patienten enthalten weit überdurchschnitt-

lich häufig (40-80%) HBV Marker. Dies gilt nicht nur in Gegenden, wo HBV endemisch ist (Südostasien, große Teile Afrikas), sondern auch in Ländern mit geringer HBV Durchseuchung wie England (Bassendine et al., 1983) und Schweiz (Pirovino et al., 1983).

- Prospektive Untersuchungen an HBsAg Trägern haben ein sehr hohes Risiko für PLC gezeigt. So entwickelten HBsAg Träger in Taiwan 390 mal häufiger PLC als Nichtinfizierte (Beasley, 1982). Leider sind noch keine vergleichbaren Daten aus anderen Ländern verfügbar.

- Woodchucks (*Marmota monax*), die mit "woodchuck hepatitis virus" (WHV) infiziert sind, entwickeln ebenfalls sehr häufig (ca. 25%) Leberkarzinome (Snyder & Summers, 1980).

- Southern Analysen von DNA aus zahlreichen humanen PLC-Geweben und PLC-Zelllinien haben ergeben, daß HBV-DNA in mindestens 50% der Tumoren chromosomal integriert ist (Brecht et al., 1981; Koshy et al., 1981). Hier drängt sich die Analogie mit Tumurviren (SV40, Polyoma Virus, Retroviren) auf, die auch im integrierten, aber nicht im episomalen Zustand, Zellen maligne transformieren.

Insgesamt gesehen ist das primäre Leberkarzinom vermutlich die Folge einer kumulativen Einwirkung verschiedener Faktoren: genetische, immunologische, HBV Infektion, Umweltexposition auf Mykotoxine. Aufgrund der sehr häufig in PLC-DNA vorhandenen integrierten HBV Sequenzen wird angenommen, daß die Integration der HBV-DNA in das Hepatozytengenom ein kritischer, vielleicht sogar der entscheidende, Schritt für die maligne Transformation der Hepatozyten ist.

Auf welche Weise kann durch eine chromosomale Integration viraler DNA die maligne Transformation einer Wirtszelle verursacht werden? Nach gegenwärtigem Wissensstand sind vier Mechanismen denkbar, von denen zwei (a,b) bereits für Tumurviren bewiesen wurden, während die beiden anderen (c,d)

bisher rein hypothetisch sind:

(a) Integrierte virale DNA führt zur Expression von Virusproteinen, welche die Zelle transformieren. Dies ist z. B. beim SV40 T-Antigen und beim Rous Sarkom Virus pp60<sup>src</sup> der Fall. Bei diesem Mechanismus ist die flankierende Wirts-DNA nicht entscheidend.

(b) Durch die Integration viraler DNA gerät eine virale Promotor- oder Enhancersequenz in die Nähe eines Wirtsonkogens, dessen Expression dadurch angeschaltet oder gesteigert wird. Durch die Überexpression des Onkogenprodukts wird die Zelle transformiert. Dieser Mechanismus wurde z.B. bei Vögeltumoren gezeigt, die durch "avian leukosis virus" induziert werden (Hayward et al., 1981).

(c) Die Integration viraler DNA bewirkt die Inaktivierung eines Wirtssuppressorgens, welches, wenn normal exprimiert, maligne Transformation verhindert. Dies konnte noch nicht bei Integration viraler DNA gezeigt werden, aber es gibt aus Untersuchungen an Zellhybriden Hinweise für die Existenz solcher Suppressorgene (Klein et al., 1971; Harris, 1979).

(d) Bei einer Deletion integrierter viraler DNA werden auch flankierende Wirtssequenzen deletiert. Die resultierende Veränderung in der Wirts-DNA verursacht eine maligne Transformation ("hit and run" Mechanismus).

Als diese Dissertation begonnen wurde, gab es nicht genügend Daten, um zu entscheiden, ob einer dieser Mechanismen für die maligne Transformation von Hepatozyten zutrifft. Es gab allerdings einige Hinweise, die vor allem gegen die Hypothese (a) sprachen, welche die konstitutive Expression eines viralen Gens fordert: in PLC-Gewebe konnten nie HBcAg oder HBeAg nachgewiesen werden (Goudeau et al., 1979; Brechot et al., 1981; Gerin et al., 1982), welches, wie weiter oben erläutert, durch die T-Zellyse HBcAg-tragender Zellen und die daraus resultierende Selektion HBcAg-loser Zellen erklärbar ist. Auch HBsAg war selten in Leberkarzinomgewebe vorhanden. Es bleibt die

Möglichkeit, daß eine Expression des X- oder P-Gens die maligne Transformation bewirkt. Den einzigen diesbezüglichen Hinweis stellt eine Charakterisierung der mRNA aus PLC/PRF/5 Zellen dar, in der zwar S- aber keine X- oder P-Gen-spezifischen Sequenzen nachgewiesen wurden (Edman et al., 1980).

Der Mechanismus (a) ist also eher unwahrscheinlich. Ein weiteres Argument gegen (a) ist die lange Zeitdauer (oft Jahrzehnte), derer es zur Ausbildung des primären Leberkarzinoms bedarf. Bei (a) ist die Integrationsstelle in der Wirts-DNA unerheblich, also sollte die Integration viraler DNA relativ schnell zum Tumor führen.

Bei den anderen drei Mechanismen (b, c, d) ist eine präzise Integration in eine kritische Region der Wirts-DNA notwendig, was sich eher mit der langen Zeitdauer für die Tumorentstehung vereinbaren läßt. Hier erhebt sich die Frage, wie viele solche spezifische Integrationsorte existieren. Zu diesem Zweck wurden von Brechot et al. (1981) und Koshy et al. (1981) DNAs aus verschiedenen PLC-Geweben isoliert, mit Restriktionsenzymen verdaut und in Southernanalysen mit  $^{32}\text{P}$ -markierter HBV-DNA hybridisiert. Es sollte dabei überprüft werden, ob nach Spaltung verschiedener PLC-DNAs, die integrierte HBV DNA enthalten, mit Restriktionsenzymen, die keine Schnittstellen in HBV DNA besitzen, HBV-spezifische Fragmente gleicher Größe entstehen. Dies wäre als erster Hinweis für die Existenz gleicher Integrationsstellen in verschiedenen PLC-DNAs zu deuten. Die beiden Gruppen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen: Koshy et al. berichteten über HBV-spezifische Hind III Fragmente gleicher Größen (12,3 kb und 6,5 kb) in verschiedenen PLC-DNAs, aber Brechot et al. konnten dies nicht bestätigen und fanden auch sonst keine HBV-spezifischen Hind III Fragmente gleicher Größe in verschiedenen PLC-DNAs. Es ist daher anzunehmen, daß es viele spezifische Integrationsstellen für HBV DNA gibt.

Um weitere Hinweise zu erhalten, ob und welcher der vier Mechanismen für die Entstehung des primären Leberkarzinoms zutrifft, ist vor allem eine genaue Analyse integrierter HBV Sequenzen und flankierender humaner DNA notwendig. Eine solche Analyse bildet den Kern der hier vorgelegten Dissertation. Sie geht speziell auf folgende Fragen ein:

- Wieviele PLC DNAs enthalten integrierte HBV Sequenzen?
- Gibt es gleiche Integrationsstellen für HBV-DNA in der DNA von humanen Leberkarzinomzellen verschiedenen Ursprungs? Dies wäre ein sehr starker Hinweis auf einen Mechanismus (b, c), bei dem Hepatozyten als Folge einer HBV-DNA Integration in eine kritische Region des Wirtsgenoms maligne transformiert werden. Vergleichende Southernanalysen von DNAs aus verschiedenen PLC-Geweben sollten darüber Aufschluß geben.

- Bringt eine detaillierte Charakterisierung integrierter HBV-DNA und flankierender humaner DNA weitere Hinweise auf eine onkogene Potenz von HBV, und läßt sich einer der vier Mechanismen für Zelltransformation durch integrierte virale DNA belegen? Es wurden Genbanken von DNA aus PLC-Zellen hergestellt und Fragmente isoliert, die integrierte HBV-DNA sowie flankierende DNA enthalten. Die Organisation der integrierten viralen DNA wurde durch Restriktionskartierung analysiert. Etwaige onkogene Eigenschaften und Expression der viralen Sequenzen wurden nach Einschleusung dieser Inserts in Mauszellen untersucht.

Da die Isolierung und umfassende Charakterisierung solcher Fragmente sehr arbeitsaufwendig ist, wurde dieses Projekt auch von Stefan Koch in einer parallel durchgeführten Dissertation bearbeitet. S. Koch, dessen Ergebnisse im Verlauf dieser Arbeit mehrfach zitiert werden, widmete sich schwerpunktmäßig der Sequenzanalyse der von ihm isolierten HBV-spezifischen Fragmente.

- Spielen bei Integration der HBV-DNA, wie von Gray et al. vorgeschlagen, terminal redundante Sequenzen aus dem "Nick-Gap" Zwischenraum eine Rolle? Die Integrationsstellen

der viralen DNA wurden in den erhaltenen Inserts lokalisiert.

- Sind HBcAg Gen-spezifische Sequenzen in PLC-Zellen defekt oder nur stumm? Hierzu wurden PLC/PRF/5 Zellen unter veränderten Kulturbedingungen - als Tumoren in nu/nu Mäusen - gezüchtet und auf HBc/HBeAg Expression untersucht.

## C. ERGEBNISSE

### 1. NACHWEIS CHROMOSOMAL INTEGRIERTER HBV SEQUENZEN IN DER DNA VON HUMANEN LEBERKARZINOMGEWEBEN

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde DNA aus primären Leberkarzinomgeweben (PLC) auf Anwesenheit chromosomal integrierter HBV-Sequenzen untersucht. Ein Vergleich integrierter HBV-DNA aus verschiedenen PLC-Geweben sollte zeigen, ob es möglicherweise Hinweise auf gemeinsame Integrationsstellen gibt. HBV-DNA positive PLC-DNAs wurden zuerst in einem Tüpfeltest identifiziert und daraufhin mittels der "Southern blotting" Methode auf integrierte HBV-Sequenzen untersucht. Dabei konnten die Größen der nach Restriktionsverdau verschiedener PLC-DNAs erhaltenen HBV-spezifischen Fragmente miteinander verglichen werden.

#### 1.1 Gewebeproben

Die Gewebeproben (siehe Materialteil) waren 13 Patienten aus verschiedenen Ländern entnommen worden und stammten aus primären Leberkarzinomen (Tumor) oder benachbartem, nicht malignem Lebergewebe (Peritumor). Die Proben waren entweder durch Biopsien (alle Proben aus Taiwan) oder Autopsien (alle anderen) erhalten und seitdem bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert worden. Biopsien hatten sehr wenig Material ergeben (oft nicht mehr als 10-20 mg Gewebe) und reichten daher manchmal nur für einen Versuch.

Erst nach Abschluß der hier vorgestellten Analyse wurden serologische Daten erhalten, die in Tabelle I (Seite 40) zusammengefasst sind. Aus der serologischen Analyse ergibt sich, daß alle auf HBsAg untersuchten Patienten chronische HBsAg Träger waren. Das Serum von Patient Fl war darüberhinaus von Dr. F. Barin, Toulouse, auf andere HBV-Antigene und -Antikörper untersucht worden und enthielt neben HBsAg auch HBeAg und anti-HBc, aber kein anti-HBs oder anti-HBe. Zusätzlich waren in der Leber durch Immunfluoreszenz HBsAg und HBcAg nachgewiesen worden.

## 1.2 Tüpfeltest Analyse

Durch seine Einfachheit und Sensitivität ist der Tüpfeltest ("dot blot") besonders geeignet, schnell über die Anwesenheit einer bestimmten DNA Sequenz Aufschluß zu geben. Der Test läßt sich außerdem quantitativ auswerten, unterscheidet aber nicht zwischen integrierter und episomaler DNA.

Aus allen Proben wurde DNA isoliert, wie im Methodenteil beschrieben. Einige der DNAs, besonders solche, die aus den oft nekrotischen Peritumorgewebe isoliert wurden, waren - vermutlich durch in den zerstörten Zellen freigesetzte Nukleasen - zu kleinen Fragmenten abgebaut, wie anhand analytischer Agarosegelelektrophorese festgestellt wurde. Diese waren jedoch noch groß genug, um effizient an Nitrozellulose zu binden (> 200 bp). 20 µg DNA wurden auf einen Nitrozellulosefilter aufgetropft und mit HBV-DNA hybridisiert. Dazu war ein 3,2 kb Eco RI Fragment, welches das gesamte HBV Genom repräsentiert, aus dem Plasmid pAO1-HBV (Cummings et al., 1980) durch präparative Gelelektrophorese isoliert und durch "Nick Translation" mit <sup>32</sup>P radioaktiv markiert worden (siehe Methoden). Als Positivkontrollen fungierten sowohl 5 µg dieses HBV

Fragments als auch 20 ug PLC/PRF/5 DNA - isoliert aus einer Leberkarzinomzelllinie gleicher Bezeichnung, die ca. 6 integrierte HBV Kopien enthält (Brechot et al., 1980; Chakraborty et al., 1980; Edman et al., 1980). Als Negativkontrollen diente DNA aus humaner foetaler Leber, aus Maus NIH 3T3 Zellen und aus Lachssperma.

Das Ergebnis der Tüpfeltestanalyse ist in Abb. 2 gezeigt. 5 von 7 Karzinomproben und 4 von 11 Peritumorproben enthielten HBV-DNA. Um die gebundene, radioaktive DNA zu quantifizieren, wurden gleichgroße Filterstücke ausgestanzt und cpm bestimmt. So konnte die Kopienzahl pro Zelle grob geschätzt werden. Dabei sind folgende Einschränkungen zu machen: es ist ungewiß, ob 1) alle oder nur ein Teil der Zellen HBV-DNA enthalten und 2) ob in jeder anwesenden Kopie das gesamte oder nur ein Teil des HBV Genoms vorhanden ist. Auffällig ist die hohe Menge HBV-DNA im F1 Tumor, die, wie auch schon die Anwesenheit von HBsAg im Serum und HBcAg in der Leber, auf Virusreplikation hinweist.

Im Fall von D19, T1, T2 und T6 konnten Tumor- und Peritumorgewebe miteinander verglichen werden. Eine Übereinstimmung zeigte sich jedoch nur bei T1 (Tumor und Peritumor HBV DNA positiv) und D19 (Tumor und Peritumor HBV DNA negativ). T2 Tumorgewebe enthält HBV-spezifische DNA, T2 Peritumorgewebe jedoch nicht; bei T6 ist das Gegenteil der Fall. Insgesamt ergibt sich also kein einheitliches Bild.

| KONTROLLEN          | AUFGETRAGENE<br>MENGE | CPM*5 | HBV DNA | GESCHÄTZTE<br>KOPIENZAHL./ZELLE |
|---------------------|-----------------------|-------|---------|---------------------------------|
| HBV DNA/LACHSSPERM. | 5pg/20ug              | 1855  | +       |                                 |
| PLC/PRF/5           | 20ug                  | 1031  | +       | 6                               |
| HUM.FOET.LEBER      | "                     | 110   | -       |                                 |
| MAUS NIH 3T3        | "                     | -     | -       |                                 |
| LACHSSPERMA         | "                     | -     | -       |                                 |
| HINTERGRUND         | "                     | -     | -       |                                 |

|               |      |       |   |    |
|---------------|------|-------|---|----|
| LEBERKARZINOM |      |       |   |    |
| w1            | 20ug | 578   | + | 3  |
| u1            | "    | 1159  | + | 6  |
| F1            | "    | 12077 | + | 80 |
| D19           | "    | 141   | - |    |
| T1            | "    | 405   | + | 2  |
| T2            | "    | 1777  | + | 11 |
| T6            | "    | 23    | - |    |

|           |      |     |     |     |
|-----------|------|-----|-----|-----|
| PERITUMOR |      |     |     |     |
| D11       | 20ug | 346 | +/- | 1,5 |
| D19       | "    | 23  | -   |     |
| T1        | "    | 512 | +   | 2,5 |
| T2        | "    | 78  | -   |     |
| T3        | "    | 118 | -   |     |
| T4        | "    | 14  | -   |     |
| T5        | "    | 0   | -   |     |
| T6        | "    | 422 | +   | 2   |
| T7        | "    | 73  | -   |     |
| T8        | "    | 843 | +   | 5   |
| T9        | "    | 7   | -   |     |

Abb. 2

## Tüpfeltest von Tumor- und Peritumor-DNAs.

Jeweils 20 ug DNA aus Kontrollen (PLC/PRF/5 Zellen, humaner foetaler nichtinfizierter Leber, Maus NIH 3T3 Zellen und Lachssperma), primären Leberkarzinomgeweben und nichtmalignen Geweben der gleichen Patienten (Peritumor) wurden denaturiert, auf einen Nitrozellulosefilter aufgetropft und nach Festbacken mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisiert (spezifische Aktivität= $2 \times 10^8$  cpm/ug). Anschließend wurden gleichgroße Filterstücke ausgestanzt und die gebundene HBV-DNA Menge durch Zählung radioaktiver Impulse für 5 Min. in einem Packard 3380 Betazähler quantifiziert.

### 1.3 Southern Analyse

Um Aufschluß über den Zustand der HBV-DNA - chromosomal integriert oder episomal - zu erhalten, wurden die DNAs nach der "Southern blotting" Methode untersucht (Southern, 1975). Dazu wurden sowohl DNAs verwendet, die im Tüpfeltest positiv waren (W1, U1, T1, T2, F1 Tumor und T1 Peritumor) als auch solche, die nicht im Tüpfeltest untersucht worden waren (T3, T5 Tumor), da die DNA-Menge in einigen Fällen nicht für beide Untersuchungsmethoden ausreichte. Die im Tüpfeltest positiven Peritumor DNAs D11, T6 und T8 waren für die Southern Analyse nicht geeignet, da sie wegen des nekrotischen Gewebezustands zu kleinen Fragmenten abgebaut worden waren.

Die DNAs wurden mit zwei Restriktionsenzymen gespalten:

- Hind III, da alle drei zum Zeitpunkt des Versuches bekannten HBV-DNA Sequenzen (Galibert et al., 1979; Pasek et al., 1979; Valenzuela et al., 1980) keine Hind III Schnittstelle besitzen. HBV-spezifische Fragmente, die größer als das Virusgenom (3,2 kb) sind, würden daher eine chromosomale Integration der HBV-DNA implizieren.
- Eco RI, weil zwei der bekannten HBV-Sequenzen eine Eco RI Schnittstelle enthalten (die Sequenz von Pasek et al., die allerdings unvollständig ist, enthält keine Eco RI Stelle). Bei integrierter HBV-DNA (durch Hind III Verdau bestimmt) würde eine 3,2 kb Bande nach Eco RI Verdau eine "head to tail" tandemartige Integration (zwei HBV Genome in gleicher Orientierung hintereinander) nahelegen.

Nach Restriktionsenzymverdau wurden die entstandenen DNA-Fragmente auf einem 0,8 prozentigen Agarosegel aufgetrennt. Ein kompletter Verdau wird bei beiden Enzymen durch eine Bande bei 1,9 kb (Hind III), bzw. bei 1,8 kb (Eco RI) ersichtlich. Diese Banden stellen repetitive Wirts-DNA Sequenzen dar, welche eine Schnittstelle für

Hind III bzw. Eco RI besitzen. Die Fragmente wurden auf einen Nitrozellulosefilter übertragen und mit radioaktiv markierter  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisiert. Als Kontrolle wurde wiederum PLC/PRF/5 DNA verwendet.

In der Southern Analyse mit Restriktionsenzymen, die eine oder keine Schnittstelle in der HBV-DNA besitzen, kann HBV-spezifische DNA nur nachgewiesen werden, wenn sie zumindest in einem Großteil der Zellpopulation an der gleichen Stelle integriert ist und somit im Gel zu einer im Hybridisierungstest positiven Bande führt. Das Fehlen HBV-spezifischer Banden bedeutet nicht unbedingt die Abwesenheit von HBV DNA, sondern könnte auch durch eine heterogene Zellpopulation oder durch Abbau der DNA zustande kommen. Derartige falsch-negative Ergebnisse können im Tüpfeltest nicht auftreten, sodaß sich dieser und die Southern Analyse ergänzen.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3 gezeigt. Durch die Hind III Analysen ist ersichtlich, daß in der PLC/PRF/5 Zelllinie (Banden bei 32, 25, 18, 10,7, 6,0, 4,4 und 1,9 kb), den Tumoren U1 (20,6, 5,1 und 2,6 kb), T2 (9,9, 6,8 und 5,8 kb), W1 (14,5 und 9,5 kb; die Bande bei 6,0 kb ist auf eine Kontamination mit HBV-spezifischer DNA zurückzuführen), T1 (4,8 kb) und im Peritumor T1 (9,0 kb) HBV-DNA chromosomal integriert ist, da in jeder DNA HBV-spezifische Banden größer als 3,2 kb vorhanden sind. Da alle nach Hind III Verdau entstandenen HBV-spezifischen Fragmente unterschiedlich lang sind, gibt es keinerlei Hinweise auf gemeinsame Integrationsstellen in den verschiedenen Tumoren. Banden bei 12,3 kb und 6,5 kb, wie von Koshy et al. (1981) in verschiedenen Tumor DNAs gezeigt, wurden außer in PLC/PRF/5 DNA (hier als 10,7 und 6,0 kb angegeben, siehe auch spätere Klonierung dieser Fragmente), wie auch schon von den erwähnten Autoren beschrieben, nicht beobachtet.

DNA aus dem Tumor T5 hybridisierte nicht mit HBV DNA. Außerdem hatte sich bereits im Tüpfeltest erwiesen, daß in den Tumorproben D19 und T6 keine HBV DNA enthalten ist. Als Erklärung für diese negativen Ergebnisse kommen zum einen technische Probleme in Betracht. Diese gelten in erster Linie für die Southern Analyse, da hier bei teilweise abgebauter DNA kein starkes Signal entsteht. Beim Tüpfeltest tritt diese Schwierigkeit aber nicht auf und somit entfallen technische Probleme als Erklärung. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit anderer Faktoren als HBV in der Entstehung der erwähnten Tumoren oder ein "hit-and-run" Mechanismus (siehe Einleitung, Seite 27).

In Fl-DNA sieht man einen dicken Schmier, der sich von 3,2 kb nach unten erstreckt. Dies bestätigt den Verdacht auf Virusreplikation, da die Größe des HBV Genoms 3,2 kb beträgt und somit während aktiver Virusreplikation sowohl komplette (3,2 kb) wie wachsende HBV Moleküle (kleiner als 3,2 kb) zu erwarten sind. Die Bande bei 1,0 kb im T3 Tumor kann nicht näher interpretiert werden, da die DNA stark abgebaut war und sich an dieser Position die größte DNA-Menge befand. Somit ist in diesem Fall nur gezeigt, daß HBV-DNA anwesend ist, nicht aber ob sie integriert oder episomal vorliegt.

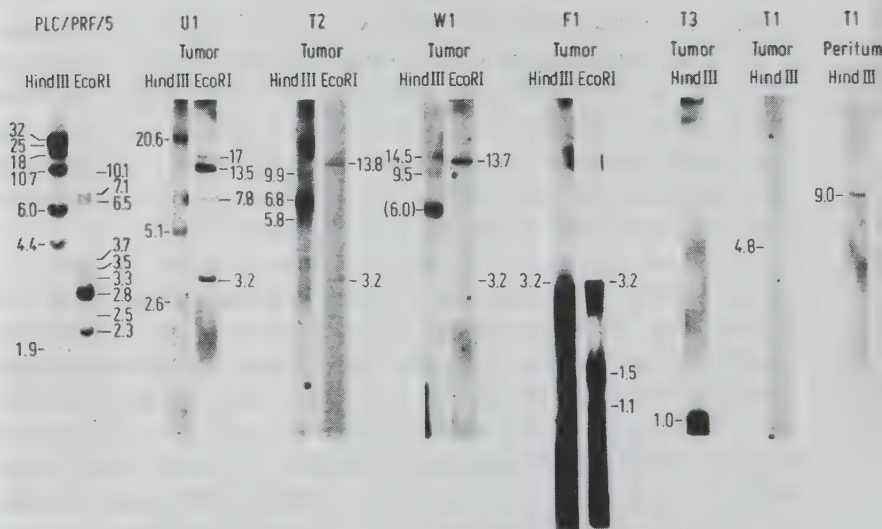


Abb. 3

Southern Analyse von Tumor- und Peritumor-DNAs.

Jeweils 20 µg DNA wurden entweder mit Hind III oder Eco RI vollständig verdaut und entstandene Fragmente auf einem 0,8 prozentigen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA im Gel wurde denaturiert und neutralisiert, auf einen Nitrozellulosefilter übertragen und mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA (spezifische Aktivität =  $2 \cdot 3 \cdot 10^8$  cpm/µg) hybridisiert. Die Zahlen zeigen die Größen (in kb) der nach 1-7 tägiger Exponierung sichtbaren Banden an.

Die mit Eco RI gespaltenen DNAs aus den Tumoren U1, T2 und W1 ergeben eine Bande bei 3,2 kb, bzw. 3,3 kb im Fall von PLC/PRF/5 DNA. Darüberhinaus sind in allen Fällen noch weitere, meist höherliegende Banden ersichtlich (siehe Abb. 3). Diese DNAs zeigen nach Hind III Verdau Banden mit mehr als 3,2 kb, enthalten also integrierte HBV-DNA. Die Eco RI Fragmente von 3,2 kb (Größe des Virusgenoms), deuten daher auf eine "head to tail" tandemartige Integration hin, bei der zwei oder mehr Virusgenome in gleicher Orientierung hintereinander integriert sind.

Die bei drei Tumor DNAs (U1, T2, W1) auftretende Eco RI Bande bei ca. 13,5 kb stellt einen Hinweis auf gleiche Integrationsorte dar. Da jedoch in den Hind III Spaltmustern dieser drei DNAs keine Banden gleicher Größe festzustellen sind, sind die erwähnten Eco RI Fragmente vermutlich aus Zufall von ähnlicher Größe (die Größenbestimmung in dem Bereich über 10 kb ist außerdem sehr ungenau).

In den Proben einiger HBsAg-positiver Patienten (T4, T5, T7 und T9) konnte keine HBV DNA nachgewiesen werden. Entweder befindet sich die zur HBsAg Expression notwendige HBV DNA in anderen hier nicht untersuchten Leberregionen oder außerhalb der Leber. Hinweise für extrahepatische HBV Replikation sind bereits erwähnt worden (siehe Einleitung, Seite 15).

#### 1. 4 Zwischenzusammenfassung

Die Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefasst werden:

1) Viele Leberkarzinomgewebe (4 von 9; Einzelheiten siehe Tabelle I) enthalten chromosomal integrierte HBV-DNA (T3

Tumor DNA enthält HBV-spezifische Sequenzen, aber es ist unklar, ob diese integriert sind),

2) Es gibt keine Hinweise für gleiche Integrationsstellen in verschiedenen Tumoren,

3) "head to tail" tandemartig integrierte HBV-DNA Kopien sind anscheinend häufig, da alle mit Eco RI verdauten Tumor DNAs, die integrierte HBV-DNA enthalten, eine Bande bei 3,2 kb (Größe des Virusgenoms) zeigen.

4) Auch in nicht malignem Lebergewebe gibt es chromosomal integrierte HBV-DNA. Die unterschiedliche Größe der HBV-spezifischen Fragmente in T1 Tumor- und Peritumor-DNA weisen jedoch auf verschiedene Integrationsorte hin.

5) In fünf Tumor DNAs (siehe Tabelle I) konnte keine integrierte HBV DNA festgestellt werden. Als Erklärung für die maligne Transformation verbleiben daher neben technischen Mängeln entweder ein "hit and run" Mechanismus oder eine Rolle anderer Faktoren als HBV (z.B. Aflatoxin oder Alkohol).

#### Tabelle I

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Tüpfeltest und Southern Analyse (Seite 41).

Die Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von HBV-DNA in den untersuchten Geweben ist in der Spalte HBV-DNA angegeben. Sofern nicht ermittelt werden konnte, ob die HBV-DNA episomal oder integriert vorliegt, wurden die Ergebnisse zwischen den Spalten 'epis.' und 'integr.' eingetragen. Die Buchstaben in Klammern auf der rechten Seite geben an, ob die Ergebnisse durch Tüpfeltest (T) oder Southern Analyse (S) oder mit beiden Methoden (TS) ermittelt wurden. Außerdem sind Herkunftsland und Anwesenheit von HBsAg im Serum der Patienten angegeben.

Tabelle I

| <u>Tumor</u> | <u>Herkunft</u> | <u>Serum HBsAg</u> | <u>HBV DNA</u> |         |
|--------------|-----------------|--------------------|----------------|---------|
|              |                 |                    | epis.          | integr. |
| W 1          | BRD             | +                  |                | +       |
| U 1          | USA             | N.T.               |                | +       |
| D 19         | Senegal         | N.T.               | -              |         |
| F 1          | Frankreich      | +                  | +              |         |
| T 1          | Taiwan          | +                  |                | +       |
| T 2          | "               | +                  |                | +       |
| T 3          | "               | +                  | +              |         |
| T 5          | "               | +                  | -              |         |
| T 6          | "               | +                  | -              |         |

| <u>Peritumor</u> | <u>Herkunft</u> | <u>Serum HBsAg</u> | <u>HBV DNA</u> |         |
|------------------|-----------------|--------------------|----------------|---------|
|                  |                 |                    | epis.          | integr. |
| D 11             | Senegal         | N.T.               | +/-            |         |
| D 19             | "               | N.T.               | -              |         |
| T 1              | Taiwan          | +                  |                | +       |
| T 2              | "               | +                  | -              |         |
| T 3              | "               | +                  | -              |         |
| T 4              | "               | +                  | -              |         |
| T 5              | "               | +                  | -              |         |
| T 6              | "               | +                  | +              |         |
| T 7              | "               | +                  | -              |         |
| T 8              | "               | +                  | +              |         |
| T 9              | "               | +                  | -              |         |

## 2. CHARAKTERISIERUNG INTEGRIERTER HBV-DNA

### 2.1 Klonierung und Kartierung integrierter HBV-DNA

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, daß in vier von neun humanen, primären Leberkarzinomgeweben chromosomal integrierte HBV-DNA vorliegt. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, daß HBV-DNA Integration und PLC-Entstehung in einem kausalen Zusammenhang stehen.

In vier PLC-DNAs konnten jedoch keine integrierten HBV Sequenzen nachgewiesen werden. Für die PLC Entstehung in diesen Fällen ist zum einen ein "hit and run" Mechanismus denkbar, bei dem auch integrierte HBV DNA die kritische Rolle spielt, aber später nicht mehr nachweisbar ist. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß außer integrierter HBV DNA auch andere Faktoren (z. B. Aflatoxin, Alkohol) die Entstehung von Leberkarzinomen auslösen können.

Wie in der Einleitung erläutert, ist ein Mechanismus denkbar, wonach integrierte HBV-Sequenzen die Expression zellulärer Gene (z.B. Onkogene) so beeinflussen, daß die Wirtszelle maligne transformiert wird. Um diese Hypothese zu testen, ist eine detaillierte Charakterisierung integrierter HBV-DNA und flankierender humaner DNA erforderlich. Eine Analyse integrierter HBV-Sequenzen sollte außerdem Licht auf den Integrationsmechanismus der HBV-DNA werfen. Die Voraussetzung für eine solche Analyse ist die Klonierung der integrierten HBV Sequenzen, da nur auf diese Weise genügend Material in reiner Form zu gewinnen ist. Als Ausgangsmaterial wurde DNA aus der PLC/PRF/5 Zelllinie verwendet, da größere DNA Mengen aus der Zellkultur leicht erhältlich waren. PLC/PRF/5 Zellen enthalten mehrere integrierte HBV Kopien (siehe Einleitung). Dadurch wird eine Charakterisie-

rung verschiedener integrierter HBV Genome möglich. Allerdings ist vielleicht nur eines dieser integrierten HBV Genome für die maligne Transformation von Bedeutung. Eine Charakterisierung der anderen HBV-Sequenzen würde daher keinen Aufschluß auf den Transformationsmechanismus geben.

### 2.1.1 Klonierung

Um chromosomal integrierte HBV-DNA zu klonieren, wurde im Prinzip die Methode von Maniatis et al. (1978) verwendet. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 4 schematisch dargestellt. In Lambdavektoren wurden Genbanken von DNA aus PLC/PRF/5 Zellen hergestellt und HBV-spezifische rekombinante Phagen durch Hybridisierung identifiziert.

Zum Zeitpunkt dieses Versuches war die Nukleotidsequenz von drei HBV Subtypen bekannt (Galibert et al., 1979; Pasek et al., 1979; Valenzuela et al., 1980), die alle keine Hind III Schnittstelle besitzen. Nach Hind III Spaltung entstehende Fragmente, die größer als 3,2 kb (Länge des Virusgenoms) sind, sollten also integrierte HBV-DNA darstellen, die auf beiden Seiten von humaner DNA flankiert sind (Abb. 4).

Die folgenden Vektoren (Murray et al., 1977) wurden zur Klonierung verwendet:

- Lambda NM 728: ein Insertionsvektor mit einer zur Klonierung geeigneten Hind III Schnittstelle (siehe Abb. 4), die im cI Gen (Repressorgen) liegt. Insertion eines fremden

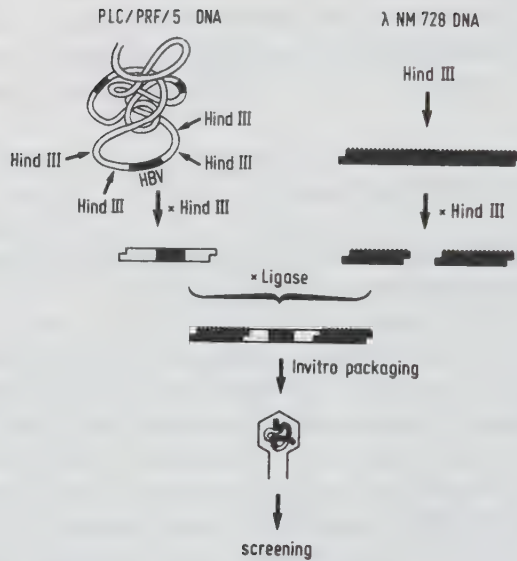


Abb. 4

Strategie zur Klonierung integrierter HBV-DNA.

PLC/PRF/5 DNA (weiß), die mehrere integrierte HBV Kopien (schwarze Balken) enthält, wurde mit Hind III verdaut. Aufgrund der veröffentlichten HBV Nukleotidsequenzen wurde angenommen, daß Hind III keine Schnittstelle in der integrierten HBV-DNA besitzt. Die Hind III Fragmente wurden mit ebenfalls Hind III verdauter Vektor DNA (Lambda NM 728, schwarze gezackte Balken) ligiert, in vitro verpackt und ausplattiert. Die entstandenen Plaques wurden durch Hybridisierung mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA auf Anwesenheit HBV-spezifischer Sequenzen überprüft.

DNA Fragments führt zu Inaktivierung des Repressorgens und dadurch zu klaren, statt trüben Plaques. Der Vektor hat eine Aufnahmekapazität von 0-14,5 kb und eignet sich daher zur Klonierung der PLC/PRF/5 Hind III Fragmente von 10,7, 6,0, 4,4 und 1,9 kb (Abb. 4).

- Lambda NM 762: ein Deletionsvektor mit zwei Hind III Schnittstellen, zwischen denen ein supF Fragment liegt, das zur Unterscheidung von rekombinanten und nichtrekombinanten Phagen dient (siehe unten). Die Kapazität beträgt 4,5-17,2 kb, erlaubt also die Klonierung des 6,0, 10,7 und eventuell des 4,4 und 18 kb Fragments.

Zuerst wurden Verpackungsextrakte hergestellt (siehe Methoden) und die Effizienz des Systems optimiert. Dazu wurde Vektor DNA verpackt, auf E.coli C 600 (für Lambda NM 728) oder E.coli ED 8538 (für Lambda NM 762) ausplattiert und die entstandenen Plaques gezählt. Unverdaute, mit Hind III verdaute, und nach Verdau wieder mit sich selbst ligierte Lambda DNA wurden verglichen. Tab. II zeigt ein solches Ergebnis:

Tabelle II

| <u>Lambda DNA</u> | <u>Plaques/ug</u> |
|-------------------|-------------------|
| unverdaut         | $9 \times 10^7$   |
| Hind III verdaute | $2 \times 10^5$   |
| ligiert           | $9 \times 10^6$   |
| Kontrolle         | 0                 |

Tabelle II

Verpackungseffizienz ligierter Lambda DNA.

Unverdaute, Hind III verdaute und nach Verdau wieder mit sich selbst ligierte Lambda NM 762 DNA wurde in vitro verpackt, auf E.coli ED 8538 ausplattiert und die enstandenen Plaques ausgezählt. Die Ergebnisse wurden auf Anzahl der Plaques pro ug DNA umgerechnet.

Nun wurden Hind III gespaltene Lambda NM 728 DNA und Lambda NM 762 DNA mit Hind III verdauter PLC/PRF/5 DNA in verschiedenen Verhältnissen ligiert, verpackt und Plaques ausgezählt (Tab. III). In beiden Fällen erwies sich dabei ein Ligierungsverhältnis von 3:1 (PLC/PRF/5:Lambda; w/w) als optimal. Außerdem wurde das Verhältnis von rekombinanten zu nichtrekombinanten Plaques bestimmt. Im Fall von Lambda NM 728 wurden trübe und klare Plaques auf E.coli C600 ausgezählt. Lambda NM 762 wurde auf Xgal Platten und auf E.coli ED 8538 ausplattiert. Dieser Stamm besitzt eine amber Mutation im lacZ Gen (Beta-Galaktosidasegen), welche durch das supF Fragment im intakten Lambda NM 762 komplementiert wird. Xgal Platten enthalten das Beta-Galaktosidasesubstrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Beta-D-Galaktosid (Xgal), von dem durch die Enzymaktivität ein Farbstoff freigesetzt wird, der die Plaques blau färbt. Rekombinante Phagen haben kein supF Fragment und bilden weiße Plaques.

Tabelle III

| <u>DNA</u>                          | <u>Plaques/ug</u> | <u>% Rekombinante</u> |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| Lambda 728 lig                      | $1,4 \times 10^5$ |                       |
| Lambda 728 +<br>PLC/PRF/5 lig (1:3) | $2 \times 10^5$   | 40 %                  |
| Lambda 762 lig                      | $10^6$            |                       |
| Lambda 762 +<br>PLC/PRF/5 lig (1:3) | $7 \times 10^4$   | 60 %                  |
| Kontrolle                           | 0                 |                       |

## Tabelle III

Verpackungseffizienz von Lambda DNA, mit PLC/PRF/5 DNA ligiert (Seite 46).

Lambda NM 728 und NM 762 DNA wurde mit Hind III verdaut und entweder mit sich selbst oder mit Hind III verdauter PLC/PRF/5 DNA ligiert. Die DNAs wurden in vitro verpackt, auf E.coli C600 (NM 728) oder E.coli ED 8538 (NM 762) ausplattiert (Lambda NM 762 Phagen auf Xgal Platten) und die Plaques ausgezählt. So konnte die Anzahl der Plaques pro  $\mu$ g Lambda DNA und der prozentuale Anteil rekombinanter Phagen (siehe Text) ermittelt werden.

Unter der Annahme, daß die Komplexität des humanen Genoms ca.  $5 \times 10^9$  bp beträgt und von Hind III statistisch alle  $5 \times 10^3$  bp gespalten wird, ergeben sich ca.  $10^6$  verschiedene Hind III Fragmente des humanen Genoms. Da ein erheblicher Anteil dieser Fragmente entweder zu klein oder zu groß ist, um nach Ligierung mit einem der beiden Lambdavektoren verpackt zu werden (siehe weiter oben), müssen  $10^5$ - $10^6$  rekombinante Phagen überprüft werden, um mit hoher Wahrscheinlichkeit HBV-spezifische Klone zu erhalten. Die in Tabelle III ersichtliche Verpackungseffizienz in beiden Vektorsystemen reichte aus, um mit einigen  $\mu$ g PLC/PRF/5 DNA genügend rekombinante Phagen zu erhalten.

Es wurden also mit den beiden Vektoren Genbanken von PLC/PRF/5 DNA hergestellt, wobei die in den Testansätzen optimierten Bedingungen beibehalten wurden. Für Lambda NM 728 wurden E.coli POP 13B und für Lambda NM 762 E.coli HB101 Zellen verwendet, da beide Bakterienstämme rekombinationsdefekt sind. E.coli POP 13B hat den zusätzlichen Vorteil, daß nur rekombinante Phagen wachsen können. Diese Zellen besitzen eine Mutation im *lyc 7* Gen, welches eine Überproduktion des Lambda *cI* Repressors bewirkt und somit zu fast hundertprozentiger Lysogenie von Lambdaphagen führt. Somit können nur  $cI^-$  Phagen, die ein

Insert im cI Gen tragen, Plaques bilden.

Die ligierte Phagen DNA wurde in vitro verpackt und die Phagen auf  $441 \text{ cm}^2$  Agaroseplatten ausplattiert. Nach Übertragung der Phagen-DNA auf Nitrozellulosefilter wurde mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisiert. Abb. 5 zeigt das Ergebnis einer solchen Hybridisierung: in 5A sind zwei HBV-positive Plaques zu erkennen, die sich auf einem Duplikatfilter (5B) an denselben Stellen befinden. In der Lambda NM 728 Bank wurde nur ein positiver Plaque in  $10^7$  rekombinanten Phagen gefunden, während in der NM 762 Bank drei positive in  $6 \times 10^5$  Rekombinanten entdeckt wurden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die NM 728 Bank wesentlich dichter ausplattiert wurde ( $5 \times 10^5$  Plaques/ $441 \text{ cm}^2$  Platte) als die NM 762 Bank ( $10^5$  Plaques/Platte), wodurch kleinere Plaques entstanden und auch Effekte kompetitiven Wachstums auftraten.

Die insgesamt vier als HBV-positiv identifizierten Plaques wurden plaque-gereinigt (Abb. 5C) und die DNA der gereinigten Phagen wurde isoliert. Nach Agarosegelelektrophorese der Hind III gespaltenen DNAs waren außer den Lambdaarmen zwei 10,7 kb (beide aus der NM 762 Bank) und zwei 6,0 kb Fragmente (jeweils eins aus der NM 728 und der NM 762 Bank) ersichtlich (Abb. 6). Sowohl die beiden 10,7 kb als auch die 6,0 kb Fragmente erwiesen sich später als identisch. Ein "Southern blot" dieses Gels (Abb. 6b) bestätigte, daß diese Fragmente HBV-spezifisch sind. Ein Vergleich mit Abb. 3 zeigt, daß es gelungen ist, zwei der PLC/PRF/5 Hind III Fragmente (10,7 und 6,0 kb) zu isolieren. Die zwei rekombinanten, HBV-spezifischen Phagen wurden mit Lambda A1 10,7 und Lambda A1 6,0 bezeichnet.

Die 6,0 kb und 10,7 kb Fragmente wurden durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und in das Plasmid pBR 327 umkloniert, um die Aufzucht zu erleichtern und die

DNA-Ausbeute zu erhöhen. Abb. 7 zeigt ein Agarosegel und einen "Southern blot" von Hind III gespaltener pAl 6.0 DNA (enthält das 6,0 kb Fragment) und pAl 10,7 DNA (enthält das 10,7 kb Fragment).

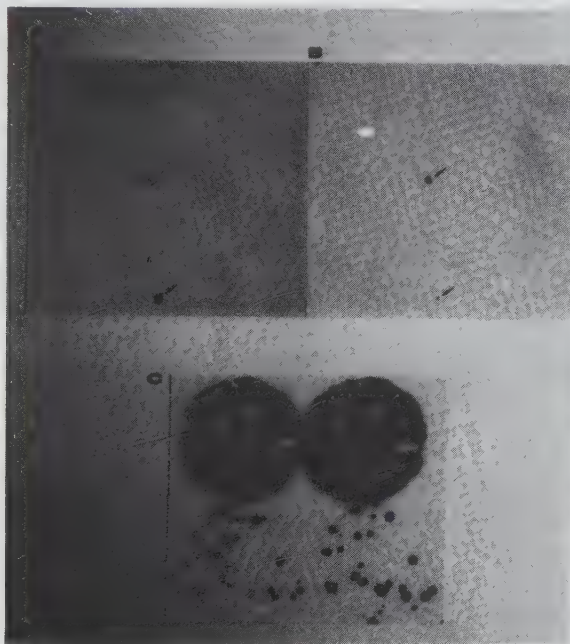


Abb. 5

Identifizierung HBV-DNA enthaltener Phagen.

$10^5$  Phagen der PLC/PRF/5 Genbank wurden auf einer  $441 \text{ cm}^2$  Agaroseplatte ausplattiert und deren DNA auf zwei übereinanderliegende Nitrozellulosefilter (A und B) übertragen. Nach Hybridisierung mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA (spezifische Aktivität =  $3,3 \times 10^8 \text{ cpm/ug}$ ) zeigten sich zwei positive Signale jeweils an den gleichen Stellen auf beiden Filtern (Pfeile in A und B). Bild C zeigt Duplikatfilter der beiden plaque-gereinigten HBV-spezifischen Phagen.

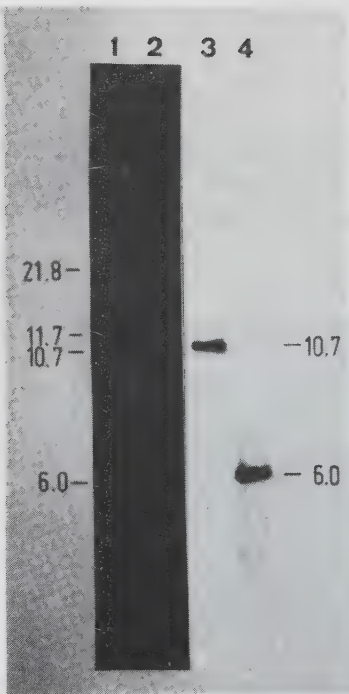


Abb. 6

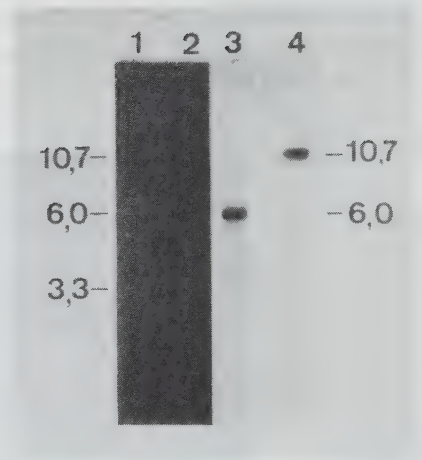


Abb. 7

Abb. 6: Agarosegel-Elektrophorese und Southern Analyse der rekombinanten HBV-spezifischen Phagen.

DNA der Phagen Lambda Al 10,7 (Spur 1) und Lambda Al 6,0 (Spur 2) wurde mit Hind III verdaut und auf einem 0,7 prozentigen Agarosegel aufgetrennt. Dabei sind die Positionen der Lambdaarme (21,8 kb, 11,7 kb) und der beiden HBV-spezifischen Inserts (10,7 kb, 6,0 kb) zu erkennen. Die 10,7 und 6,0 kb Fragmente hybridisierten mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA (Spuren 3 und 4) nach Übertragung auf Nitrozellulosefilter.

Abb. 7: Agarosegel-Elektrophorese und Southern Analyse rekombinanter HBV-spezifischer Plasmide.

Die Plasmide pAl 6,0 (Spur 1) und pAl 10,7 (Spur 2) wurden auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisiert (Spuren 3 und 4). In der Spur zwischen 1 und 2 ist Hind III verdautе Lambda DNA als Längenstandard aufgetragen.

### 2.1.2 Kartierung der Fragmente

Die klonierten HBV-spezifischen Fragmente werden im weiteren als A-6,0 und A-10,7 bezeichnet. Die Inserts wurden nach Hind III Verdau aus den Plasmiden pAl 10,7 und pAl 6,0 durch präparative Agarosegelelektrophorese isoliert und durch partielle und vollständige Restriktionsenzymspaltungen sowie Southern Analysen mit  $^{32}\text{P}$ -HBV DNA kartiert. Dadurch konnten Ausmaß und Organisation der integrierten HBV-Sequenzen ermittelt werden. Die Auswahl der Enzyme - Eco RI, Bam HI, Xho I, Bgl II, Acc I und Pst I - beruhte auf den drei damals publizierten HBV Nukleotidsequenzen der HBV-Subtypen adw 2 (Valenzuela et al., 1980), ayw (Galibert et al., 1979) und adyw (Pasek et al., 1979). Da die Spaltstellen dieser Enzyme in den sequenzierten HBV Genomen relativ gut konserviert sind, war zu hoffen, daß sie auch in A-10,7 und A-6,0 vorhanden sind. Um die erhaltenen Schnittstelle in A-10,7 und A-6,0 mit den Schnittstellen der gleichen Enzyme in HBV DNA vergleichen zu können, ist in Abb. 8 eine Restriktionskarte von HBV-DNA (Subtyp ayw) dargestellt.

#### 2.1.2.1 Das 6,0 kb Fragment (A-6,0)

Die meisten Verdau mit einem oder mehreren Enzymen wurden auf einprozentigen Agarosegelen analysiert, wobei Hind III gespaltene Lambda DNA als Längenstandard diente. Um auch die Länge kleinerer Fragmente (<1 kb) genau zu bestimmen, wurden in einigen Fällen Trennungen auch auf zweiprozentigen Agarosegelen durchgeführt und Hinf I verdaute pBR 322-DNA als Längenstandard verwendet. Eine Auswahl der entstandenen Spaltprodukte ist in Abbildung 9

gezeigt. HBV-spezifische DNA Fragmente wurden durch Übertragung auf Nitrozellulosefilter und Hybridisierung mit  $^{32}\text{P}$ -markierter HBV-DNA (aus pAO1-HBV) identifiziert (Abb. 10). Abb. 11 zeigt die auf diese Weise erstellte Restriktionskarte.

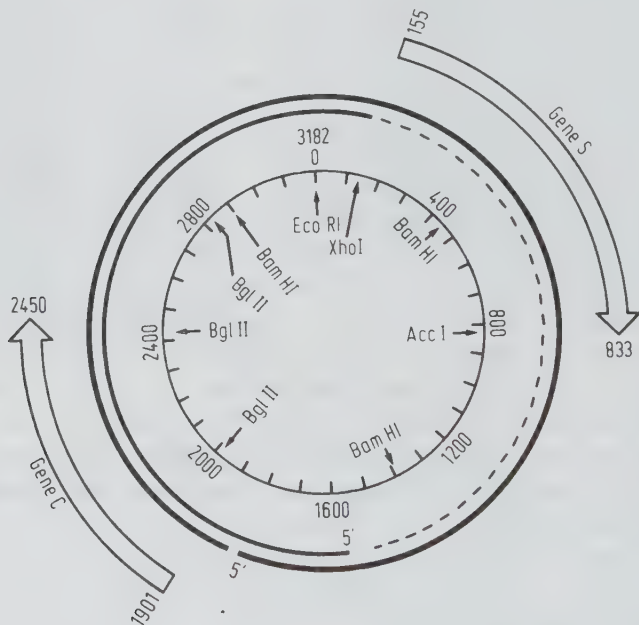


Abb. 8

Restriktionskarte des Hepatitis B Virus.

Diese Restriktionskarte (Subtyp ayw) ist eine vereinfachte Version von Abb. 1 und von Tiollais et al. (1981) übernommen. Sie zeigt die für die Kartierung von A-6,0 und A-10,7 wesentlichen Restriktionsstellen und die Positionen des S- und C-Gens.

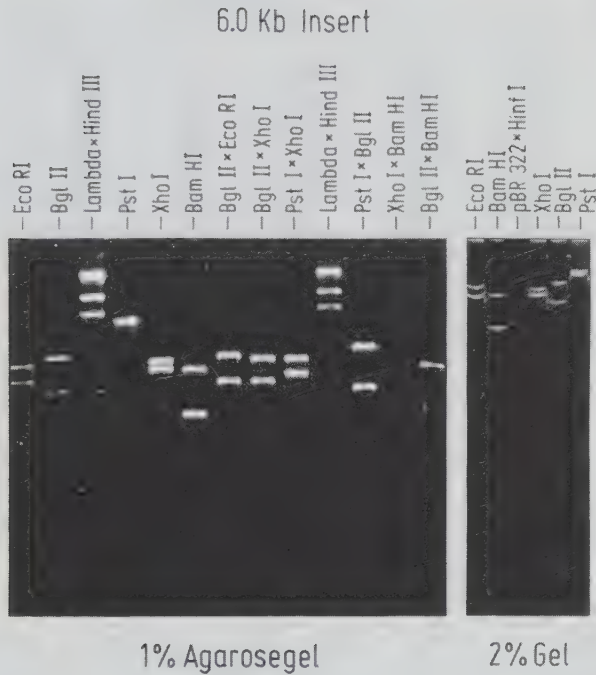


Abb. 9

Restriktionsspaltungen von A-6,0.

A-6,0 wurde mit ein oder zwei Restriktionsenzymen verdaut und die entstandenen Fragmente auf einem ein-, bzw. zweiprozentigen Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandards dienten Hind III verdaute Lambda DNA und Hinf I verdaute pBR322 DNA (Fragmentgrößen siehe Methoden).

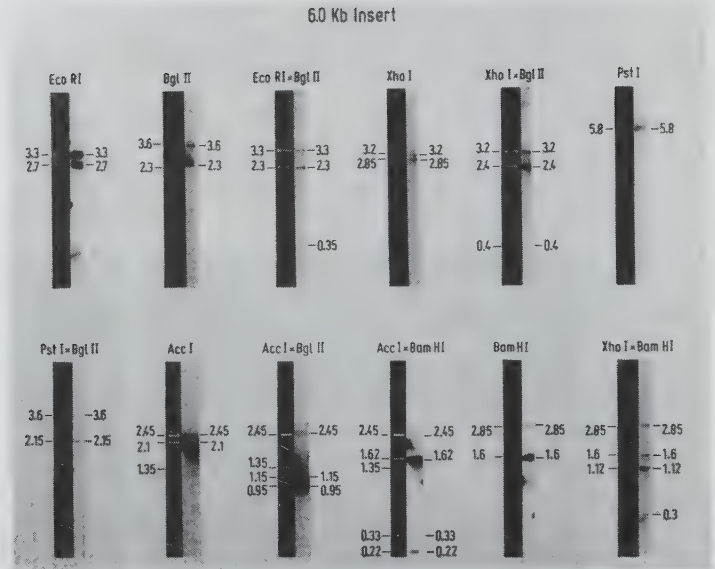


Abb. 10

Southernanalysen von A-6,0.

A-6,0 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, auf einprozentigen Agarosegelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter übertragen. Es sind jeweils die Banden im Agarosegel (links) und die mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisierenden Fragmente (rechts) gezeigt.

Abb. 11

Restriktionskarte von A-6,0 (Seite 55).

Oben sind die nach Restriktionsverdau entstandenen Fragmente gezeigt. Darunter liegt die Restriktionskarte, wobei der dicke Balken HBV-DNA und der dünne Strich humaner DNA entspricht. Unten im Bild sind die mit HBV-DNA hybridisierenden Fragmente dargestellt.

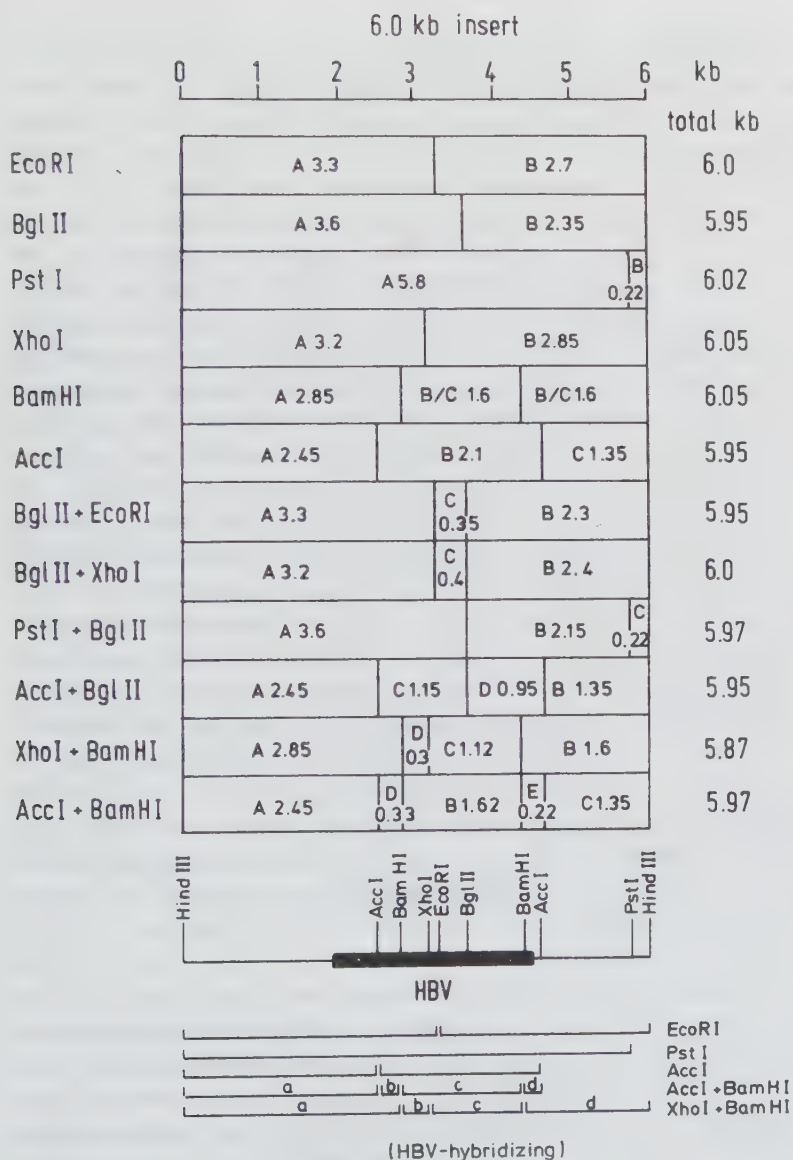


Abb. 11

Im Folgenden ist skizziert, wie diese Karte erarbeitet wurde. Alle erwähnten Ergebnisse sind in Abb. 10, zum Teil auch in Abb. 9 dargestellt. Eco RI Spaltung führt zu zwei Fragmenten (A=3,3 kb und B=2,7 kb), die beide mit HBV-DNA hybridisieren. Dies zeigt eine Eco RI Schnittstelle in den HBV Sequenzen an (Position 0 in ayw HBV-DNA; vergl. Abb. 8). Bgl II produziert ebenfalls zwei Fragmente (A=3,6 kb und B=2,35 kb), die mit HBV-DNA hybridisieren. Nach Bgl II/Eco RI Doppelverdau ergeben sich drei Fragmente, die mit HBV-DNA hybridisieren (A=3,3 kb, B=2,3 kb und C=0,35 kb). Das Eco RI B Fragment von 2,7 kb ist also nicht länger sichtbar; stattdessen erscheinen die zwei Eco RI/Bgl II Fragmente B (2,3 kb) und C (0,35 kb). Daraus läßt sich zwangsläufig ableiten, daß die Bgl II Schnittstelle 0,35 kb rechts von der Eco RI Stelle liegt. Ähnlich kann die Xho I Stelle (Xho I Fragmente A=3,2 kb und B=2,85 kb) durch Xho I/Bgl II Doppelverdau (Fragmente A=3,2 kb, B=2,4 kb und C=0,4 kb) ca. 100 bp links von der Eco RI Stelle lokalisiert werden, welches mit der Xho I Stelle an Position 129 in HBV-DNA (ayw) übereinstimmt. Ein Pst I Verdau ergibt zwei Fragmente (A=5,8 kb und B=0,22 kb), von denen nur das 5,8 kb Fragment mit HBV-DNA hybridisiert; es liegt also keine Pst I Schnittstelle in den HBV Sequenzen. Durch Pst I/Bgl II Doppelverdau (Fragmente A=3,6 kb, B=2,15 kb und C=0,22 kb) wurde das Bgl II B Fragment (2,35 kb) zu einer Größe von 2,15 kb reduziert, welches die Lokalisierung des Pst I Spaltstelle erlaubt.

Da von drei Acc I Fragmenten (A=2,45, B=2,1 und C=1,35 kb) nur zwei (A und B) mit HBV-DNA hybridisieren, liegt nur eine der beiden Acc I Stellen in der HBV-DNA. Der Doppelverdau mit Acc I und Bgl II zeigt, daß diese an der erwarteten Position (827) liegt, nämlich ca. 800 bp links von der Eco RI Stelle. Zwei Bam HI Stellen in der HBV-DNA wurden ebenfalls lokalisiert: eine Kombination von Xho I und Bam HI zeigte, daß eine Bam HI Stelle 450 bp links von der

Eco RI Stelle liegt, also in der erwarteten Position (490). Eine zweite Bam HI Stelle, die nicht in ayw HBV-DNA enthalten ist, befindet sich 1,6 kb rechts von ihr.

#### 2.1.2.2 Deletion(en) in A-6,0

Die rechte Bam HI Schnittstelle (bei ca. 4,45 kb auf der Skala in Abb. 11) im viralen Teil von A-6,0 ist in keiner der drei bekannten HBV Sequenzen vorhanden. Durch einen Vergleich der Nukleotidsequenzen von A-6,0 (R. Koshy und S. Koch) und der HBV-DNA kann die Lage der Bam HI Schnittstelle mit Position 1448 in ayw HBV-DNA identifiziert werden. Ein einzelner Basenaustausch (Position 1448) hat zu dieser Restriktionsstelle geführt. Das 1,6 kb Bam HI-Bam HI Fragment (B/C, Abb. 11) ist kleiner als das 2,2 kb Fragment, das bei Vollständigkeit der viralen Sequenzen zu erwarten wäre, was auf eine Deletion von ca. 600 bp in den HBV Sequenzen von A-6,0 hinweist. Diese liegt höchstwahrscheinlich rechts von der Eco RI Stelle (0), da alle Schnittstellen auf der linken Seite (die Eco RI Stelle eingeschlossen) mit den erwarteten übereinstimmen.

Es wurde versucht, die Deletion(en) durch Restriktionsenzymsspaltungen zu kartieren. Zwischen der Eco RI Stelle (0) und der Bam HI Stelle (1448) befindet sich nur eine weitere Restriktionsstelle (Bgl II). Da es aber in der ayw HBV-DNA drei Bgl II Stellen rechts von der Eco RI Stelle gibt, ist unklar, um welche dieser drei es sich handelt. Eine genauere Kartierung dieser Region wird dadurch erschwert, daß hier sonst keine günstigen Restriktionsstellen liegen. Einige durch die veröffentlichten HBV-Sequenzen naheliegenden Restriktionsenzyme (Fnu 4HI, Sau 96 I, Bst EII) wurden erprobt, führten aber nicht zu interpretierbaren Ergebnissen. Man muß berücksichtigen, daß die Sequenzen der verschiedenen HBV-Stämme stark variieren. Da die Identität

des hier untersuchten HBV Stammes nicht bekannt ist, wäre eine genauere Kartierung außerordentlich schwierig.

Die Möglichkeiten der Restriktionskartierung, die durch die Anwesenheit von Schnittstellen limitiert und in diesem Fall durch den Polymorphismus der HBV-DNA besonders erschwert ist, waren nun erschöpft. Eine ungleich sensitivere Methode ist die Nukleotidsequenzierung, durch die ein genauer Vergleich der Basensequenz mit den bekannten HBV Sequenzen möglich ist. Dies wurde von S. Koch ausgeführt. Dadurch kann die Deletion in A-6,0 genau lokalisiert werden: sie befindet sich zwischen C- und S-Gen (Position 2450 und 2903, bezogen auf die ayw HBV-DNA als Referenz). Damit fehlen zwar 55 Nukleotide des preS Gens, aber die von Cattaneo et al. (1983b) bestimmte Promotorregion des S-Gens ist vorhanden.

Das C-Gen ist mit Ausnahme einer Deletion des Stopkodons nicht betroffen. Dadurch wird theoretisch die Translation eines Proteinproduktes möglich, welches um mindestens 47 Aminosäuren länger als das HBcAg ist.

### 2.1.2.3 Die Integrationsstelle in A-6,0

Aus der relativ geringen Hybridisierung des Acc I A Fragments (2,45 kb, siehe Abb. 10) kann gefolgert werden, daß sich höchstens einige hundert Basenpaare HBV-spezifischer Sequenzen links von der Acc I Stelle an Position 827 befinden. Das rechte Ende der viralen Sequenzen liegt in dem BamH I/Acc I E Fragment, da dieses mit HBV-DNA hybridisiert, während das rechts von ihm gelegene Acc I C Fragment nicht hybridisiert. Wie im Folgenden beschrieben, kann die virale Integrationsstelle in A-6,0 in unmittelbarer Nähe der Bam HI Stelle (1436) in ayw HBV-DNA kartiert werden.

Restriktionsfragmente von A-6,0 wurden mit drei radioaktiven Proben hybridisiert (siehe Abb. 12): mit gesamter HBV-DNA (Probe I), einem Hind II-Bam HI Fragment (Position 997-1436 in ayw HBV-DNA, Probe II) und einem Bam HI-Hind II Fragment (1436-1675, Probe III). Wenn die Integrationsstelle zwischen der Hind II (997) und der Bam HI Stelle (1436) läge, müßte Probe II (997-1436) mit beiden Enden der viralen DNA, d.h. Fragmenten, die sowohl Virus wie Wirts-DNA enthalten, hybridisieren. Probe III (1436-1675) müßte dagegen nur mit dem rechten Ende hybridisieren. Wenn andererseits die Integrationsstelle zwischen 1436 und 1675 läge, müßte Probe III mit beiden Enden hybridisieren, Probe II aber nur mit dem linken Ende.

Stattdessen hybridisierten beide Proben (II und III) jeweils nur mit einem Ende der viralen DNA im 6,0 kb Insert (Abb. 12). Zum Vergleich sind Hybridisierungen mit gesamter HBV-DNA (Probe I) gezeigt. Probe II hybridisierte mit dem linken Ende, nämlich mit dem Acc I A Fragment (2,45 kb) und auch mit einem Acc I+Bgl II A Fragment (2,45 kb; dies wurde überprüft, da in einem einfachen Acc I Verdau auch eine 2,1 kb Bande - Fragment B- in der Nähe des A Fragments auftrat; nach Spaltung des B Fragments durch Bgl II ist die Hybridisierung des A Fragments klar zu erkennen). Probe III hybridisierte dagegen nur mit dem rechten Ende (Fragmente Acc I B: 2,1 kb; Bam HI B/C: 1,6 kb; Acc I/Bam HI B und E: 1,6 und 0,2 kb; Acc I/Bgl II D: 0,95 kb).

Da auch nach längerer Exponierung keine der beiden Proben (II und III) eine Hybridisierung mit beiden Enden zeigte, kann gefolgert werden, daß die Integrationsstelle sehr nahe der Bam HI Stelle (1436) und damit in der viralen "Gap" Region liegt. Wenn sie mehr als 20-30 bp entfernt wäre, hätte eine der beiden Proben mit beiden Enden der viralen DNA hybridisieren müssen, denn nach Marquardt & Bachmann (1983) hybridisieren homologe Nukleotidsequenzen ab 20 bp

Länge miteinander.

Weitere Einengung der Integrationsstelle ist mit dieser Methode nicht möglich, wohl aber mit Nukleotidsequenzierung. Diese wurde von R. Koshy ausgeführt. Dadurch kann die Integrationsstelle auf der linken Seite der HBV Sequenzen an Position 1408/1409 und auf der rechten Seite an Position 1417/1418 lokalisiert werden - bei der Integration waren 9 Nukleotide verloren gegangen. Die Integration erfolgte also 19 (28) Nukleotide entfernt von der Bam HI Stelle in Position 1436.



Abb. 12

### Lokalisierung der Integrationsstelle in A-6,0.

A-6,0 wurde mit Acc I und Acc I+Bgl II verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt (oben links) und auf Nitrozellulosefilter übertragen. Als Hybridisierungsprobe wurde gesamte HBV-DNA (Probe I, ganz schwarz) oder ein Hind II-Bam HI HBV-Subfragment verwendet (Probe II, Position 997-1436 in HBV-DNA, in der Mitte der Abbildung). Rechts oben ist eine elektrophoretische Analyse von Acc I, Acc I+Bam HI, Acc I+Bgl II sowie Bam HI Verdau des 6,0 kb Inserts und Hybridisierung auf Nitrozellulose mit einem Bam HI-Hind II HBV-Subfragments (Probe III, 1436-1675, im rechten Bildteil) gezeigt. Die Hybridisierungsproben sind schematisch unter den korrespondierenden Filtern dargestellt. Darunter befinden sich jeweils Skizzen von A-6,0 mit den relevanten Restriktionsschnittstellen und ganz unten nochmals die oben sichtbaren, mit den jeweiligen Proben hybridisierenden Fragmente.

#### 2.1.2.4 Das 10,7 kb Fragment (A-10,7)

Das zweite, aus PLC/PRF/5 Zellen isolierte HBV-spezifische Fragment (10,7 kb) wurde im Prinzip wie A-6,0 durch Restriktionsenzymsspaltungen und Southern Analysen kartiert (siehe Abbildungen 13, 14 und 15).

Eco RI Verdau führt zu fünf Fragmenten (A=4,4, B=2,35, C=2,04, D=1,38 und E=0,47 kb). Die B und E Fragmente hybridisieren mit  $^{32}\text{P}$ -markierter HBV-DNA (Abb. 14), also liegt eine Eco RI Stelle in den HBV Sequenzen von A-10,7. Spaltung mit Bam HI produziert drei Fragmente (A=9,7, B=0,76 und C=0,17 kb), die alle mit HBV-DNA hybridisieren (Abb. 14). Ein Eco RI/Bam HI Doppelverdau (Abb. 14) spaltet das Bam HI B Fragment zu 0,4 und 0,35 Fragmenten (Abb. 14). Die Ergebnisse zeigen, daß die von der ayw HBV-DNA erwarteten Bam HI Stellen (2906, 490) und die Eco RI Stelle (0) an den erwarteten Positionen liegen. Drei Fragmente (A=10,1, B=0,47 und C=0,135 kb) entstehen nach Verdau mit Xho I; in Abb. 13 (2% Gel) sind im Partialverdau 10,1, 0,6 und 0,47 kb Banden ersichtlich (das 0,6 kb Fragment ist aus den 0,47 und 0,135 Fragmenten zusammengesetzt). Die A und B Fragmente hybridisieren mit HBV-DNA. Ein Xho I/Bam HI Doppelverdau zeigt, daß die in HBV Sequenzen befindliche Xho I Stelle an der erwarteten Position (129) liegt. Es gibt keine Pst I und keine Bgl II Schnittstellen in der integrierten HBV-DNA, da jeweils nur ein Fragment mit HBV DNA hybridisiert (Pst I A=3,5 kb; Bgl II A=4,7 kb) ersichtlich ist. Ein Acc I Verdau ergibt vier Fragmente, die HBV-DNA enthalten (A=4,4, D=1,26, E=0,34 und F/G=0,24 kb). Ein Acc I/Xho I Doppelverdau zeigt, daß sich alle drei Acc I Stellen links von der Xho I Stelle (490) befinden. Eine von ihnen liegt an der erwarteten Position (827).

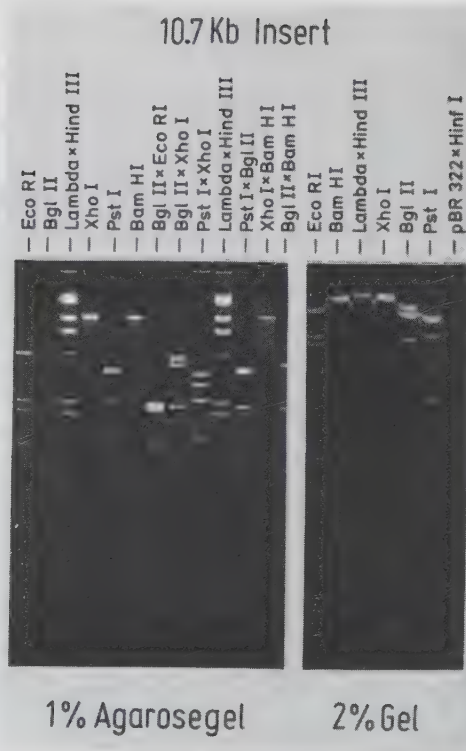


Abb. 13

Restriktionsspaltungen von A-10,7.

A-10,7 wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und auf Agarosegelen aufgetrennt (vergl. Abb. 9).

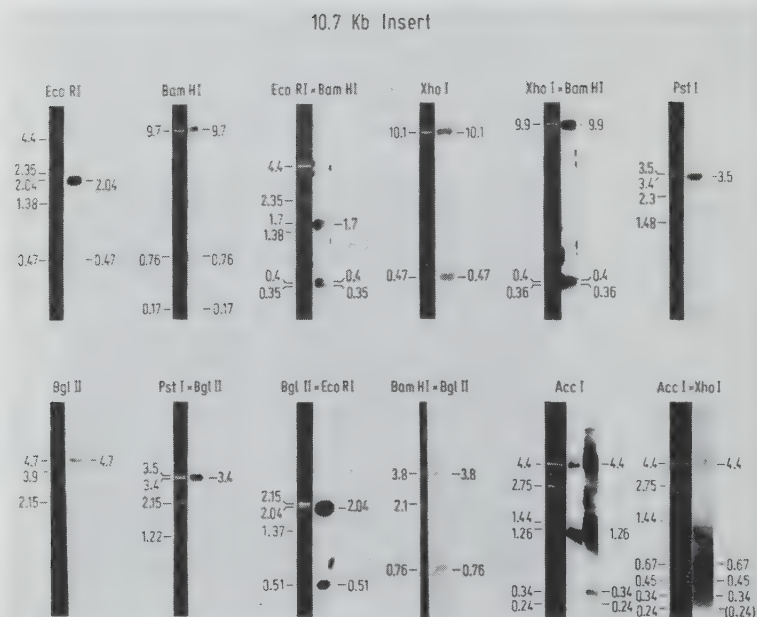


Abb. 14

Southernanalysen von A-10,7.

Agarosegelelektrophoretische Auftrennungen sind jeweils links und Hybridisierungen mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA auf Nitrozellulosefiltern rechts zu sehen (vergl. Abb. 10).

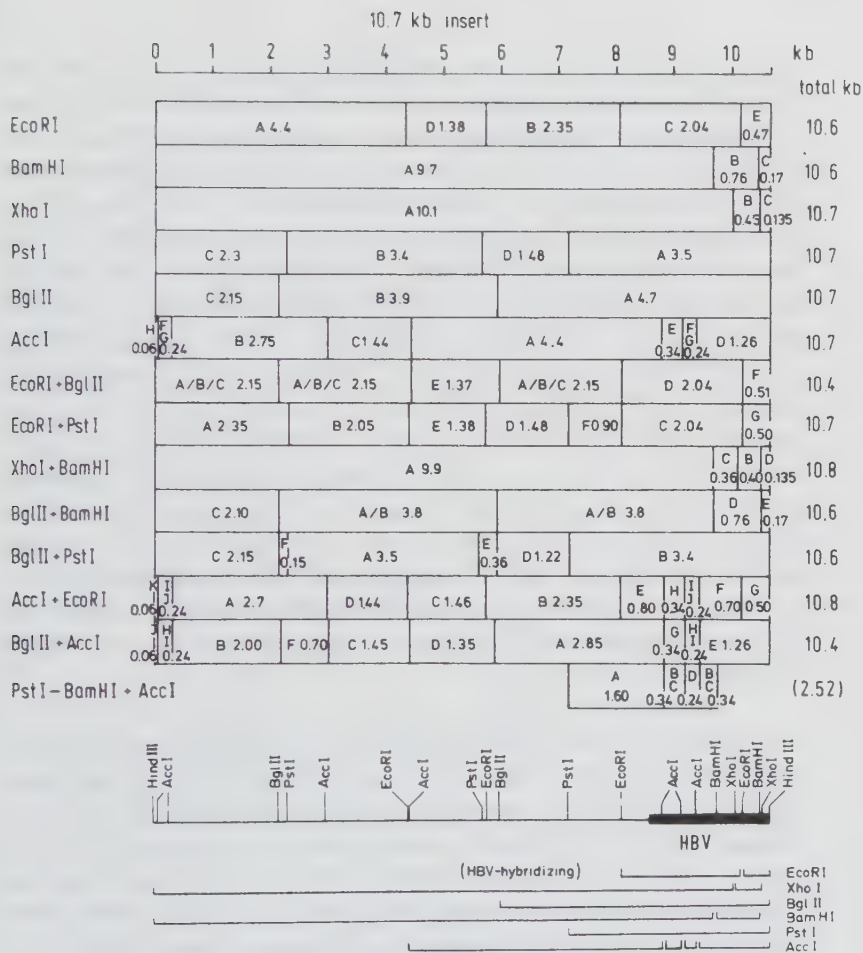


Abb. 15

Restriktionskarte von A-10,7.

Die Restriktionskarte und das Ausmaß hybridisierender HBV-DNA sind dargestellt (vergl. Abb. 11).

Die Ergebnisse legen nahe, daß die rechte virale Integrationsstelle zwischen der Bam HI Stelle (2906) und der rechts von ihr befindlichen Xho I Stelle liegt, da das Xho I C Fragment (0,135 kb) nicht mit HBV-DNA hybridisiert. Allerdings könnte auch eine sehr schwache Filterbindung des kleinen 0,135 kb Fragments erklären, warum keine Hybridisierung stattfindet. Sequenzierung (durch S. Koch) der Region zwischen der Bam HI (2906) und der Hind III Stelle zeigte, daß dies tatsächlich der Fall ist und sich die HBV Sequenzen über die Xho I Schnittstelle hinaus bis zur Hind III Stelle erstrecken. Die integrierte virale DNA besitzt also eine Hind III Schnittstelle. Dies ist sehr überraschend, da, wie bereits erwähnt, keine der damals publizierten HBV Sequenzen eine Hind III Stelle enthält. Durch diesen Umstand entgingen alle rechts von dieser Spaltstelle gelegenen HBV- und flankierenden Sequenzen der Klonierung. Das 10,7 kb Fragment enthält also nur einen Teil der integrierten HBV Sequenzen und nur an einer Seite flankierende humane DNA.

Die virale Integrationsstelle in A-10,7 liegt zwischen einer Acc I und einer Eco RI Stelle (Abb. 15), und zwar aufgrund der relativ schwachen Hybridisierung des Acc I A Fragments (Abb. 14) unweit (höchstens 100-200 bp) der Acc I Stelle. Das Acc I A Fragment hybridisiert mit der im Zusammenhang mit A-6,0 erwähnten Probe III (Bam HI-Hind II Fragment von Position 1436-1675; Ergebnis nicht gezeigt). Somit liegt die Integrationsstelle in A-10,7 mindestens 60 bp weiter in Richtung 5'-Ende des S-Stranges der HBV-DNA als die Integrationsstelle in A-6,0 (1408/1409 bzw. 1417/1418), da für die Hybridisierung mit Probe II mindestens 20-30 bp HBV-spezifischer Sequenzen zwischen Position 1436 und 1675 vorhanden sein müssen. Eine genauere Lokalisierung der Integrationsstelle konnte auch hier nur durch Sequenzierung (von S. Koch) erreicht werden: Die Integrationsstelle liegt an Position 1614/1615 in der ayw

HBV DNA, 197 (206) bp entfernt von der Integrationsstelle in A-6,0 und 188 bp entfernt von der erwähnten Acc I Schnittstelle. Somit liegt die virale Integrationsstelle in A-10,7 ebenfalls in der viralen "Gap" Region.

Ein Vergleich des Restriktionsmusters der flankierenden humanen DNA in A-6,0 und A-10,7 zeigt keine Gemeinsamkeiten. Auch die Sequenzen der Wirts-DNA (durch S. Koch ermittelt) direkt neben den Integrationsstellen sind völlig verschieden.

#### 2.1.2.5 Zwischenzusammenfassung

Die Ergebnisse der Kartierung von A-6,0 und A-10,7 lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) in beiden Fragmenten liegt die HBV-Integrationsstelle in der viralen "Gap" Region, jedoch nicht genau an derselben Position (A-6,0: 1408/1409 und 1417/1418 der ayw HBV-DNA; A-10,7: 1614/1615),
- 2) die virale DNA in A-10,7 besitzt eine Hind III Stelle, sodaß ein Teil der integrierten Virus-DNA sowie die flankierende humane DNA auf einer Seite bei dieser Klonierungstechnik verloren gegangen sind.
- 3) in A-10,7 gibt es keine erkennbare Veränderung der HBV Sequenzen gegenüber der Prototyp HBV-DNA, d.h. die klonierten Sequenzen sind wahrscheinlich kolinear mit der viralen DNA.
- 4) A-6,0 enthält eine Deletion von ca. 450 bp zwischen C- und S-Gen; die restlichen viralen Sequenzen sind anscheinend

unverändert,

5) das C-Gen in A-6,0 und das S-Gen in beiden Inserts könnten funktionsfähig sein (Anwesenheit von charakteristischen Restriktionsstellen, siehe Abb. 18),

6) die flankierenden humanen Sequenzen in beiden Inserts sind verschieden.

## 2.2 Hybridisierung mit DNA aus nichtinfizierten Zellen

Die humanen Sequenzen in A-6,0 und A-10,7 sollten mit homologen zellulären Sequenzen aus nichtinfizierten Zellen verglichen werden, um festzustellen, ob diese zellulären Sequenzen im Zuge der HBV-DNA Integration verändert wurden. Da die zellulären Loci aus nichtinfizierten Zellen nicht in klonierter Form zugänglich waren, bot sich nur die Möglichkeit einer Southern Analyse von vollständiger Human-DNA nach Restriktionsverdau mit Hind III.

Dazu wurden A-6,0 und A-10,7 durch Nick Translation mit  $^{32}\text{P}$  markiert und mit Hind III verdauter Human-DNA hybridisiert, die aus embryonalem Gehirn isoliert worden war. Da die humane DNA nicht mit HBV-DNA hybridisiert, wie durch Tüpfeltest ermittelt wurde (nicht gezeigt), sind die in Abb. 16 gezeigten Banden auf eine Hybridisierung mit flankierenden humanen Sequenzen zurückzuführen.

Der Anteil humaner DNA in A-6,0 beträgt 3,25 kb (virale DNA: 2,75 kb). Demnach wäre eine 3,25 kb Bande in nichtinfizierter DNA zu erwarten. Stattdessen hybridisierte A-6,0 mit zwei Fragmenten von 2,5 und 1,8 kb, welche zusammen 4,3 kb ergeben. Dies kann so interpretiert werden, daß durch die HBV DNA Integration in der Human-DNA eine Deletion von 1,05 kb entstanden ist und hierdurch eine Hind III Stelle eliminiert wurde.

Ein Polymorphismus in dieser Region humaner DNA kann ausgeschlossen werden, da die gleichen Fragmente (2,5 und 1,8 kb) zusätzlich zu den nur mit HBV-DNA hybridisierenden Fragmenten (vergl. Abb. 3) auch in PLC/PRF/5 DNA mit A-6,0 hybridisieren (Abb. 16). Daher ist anzunehmen, daß in PLC/PRF/5 DNA nur ein Allel durch die HBV-DNA Integration verändert worden ist, während das zweite Allel unverändert

erhalten ist.

Hybridisierung von Human DNA mit A-10,7 (Abb. 16) zeigte eine einzelne Bande bei ca. 18,0 kb (die Größenbestimmung in diesem Bereich ist ungenau). In diesem Fall kann nicht ermittelt werden, ob zelluläre Sequenzen durch die HBV-DNA Integration deletiert wurden, da durch die Hind III Stelle in der integrierten HBV-DNA in A-10,7 weder die restlichen viralen, noch flankierende humane Sequenzen auf einer Seite mitkloniert wurden. Daher fehlt in A-10,7 die für den Vergleich nötige Hind III Stelle in der humanen DNA auf dieser Seite.

Die beiden Southern Analysen zeigen außerdem: 1) daß die humanen, flankierenden Sequenzen der beiden Inserts nicht miteinander verwandt sind, denn sonst hätten sich gleiche Banden in einer Hybridisierung mit nichtinfizierter DNA ergeben, und 2) daß sie keine repetitiven DNA Sequenzen enthalten, denn sonst wären bei der Hybridisierung viele Banden aufgetreten.

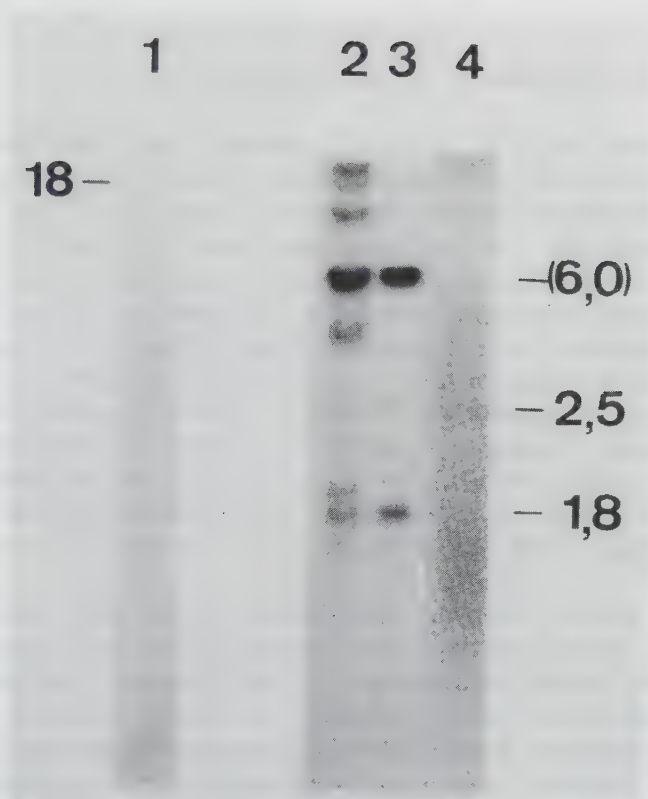


Abb. 16

Hybridisierung mit Human DNA aus nichtinfiziertem Zellmaterial.

Humane DNA aus embryonalem Gehirn wurde mit Hind III verdaut, auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit  $^{32}\text{P}$ -markierter A-10,7 DNA (Spur 1, spezifische Aktivität= $1,1 \times 10^8$  cpm/ug) und A-6,0 DNA (Spur 3, spezifische Aktivität= $3,2 \times 10^8$  cpm/ug) hybridisiert. Spur 2 zeigt Hind III verdauete PLC/PRF/5 DNA nach Hybridisierung mit A-6,0 DNA. Die 6,0 kb Bande in Spur 3 ist auf eine DNA Kontamination zurückzuführen, da sie bei einer Wiederholung der Hybridisierung (Spur 4) nicht auftritt.

### 2.3 Transformation von NIH 3T3 Zellen

Mit Hinblick auf den möglichen kausalen Zusammenhang zwischen HBV und primärem Leberkarzinom wurde geprüft, ob A-6,0 und A-10,7 onkogen wirken können. Zur Zeit ist das sensitivste und häufigst verwendete Testsystem die Maus NIH 3T3 Zelle. Es wird allgemein angenommen, daß NIH 3T3 Zellen fast alle Schritte auf dem Weg zur malignen Transformation zurückgelegt haben, sodaß es nur noch eines letzten Anstoßes zur Transformation bedarf. Dieser kann durch Aufnahme eines Onkogens erreicht werden. Morphologische Transformation ist durch dreidimensionales Zellwachstum ("Focus") auf dem NIH 3T3 Zellrasen sowie veränderte Zellmorphologie (spindelförmig statt flach ausgebreitet) ersichtlich.

Jeweils 5 ug der beiden Inserts wurden mit 15 ug Träger DNA (aus Lachsperma) vermischt und mittels der Calzium-Phosphat Methode (Graham & van der Eb, 1973) in NIH 3T3 Zellen eingeschleust. Als positive Kontrolle fungierte H-1 DNA (enthält ein kloniertes Fragment des Harvey Sarkom Virus). Ca. 1000 Foci pro ug H-1 DNA wurden erzielt, welches um eine Größenordnung unter dem publizierten Wert liegt ( $2 \times 10^4$  Foci pro ug; Ellis et al., 1981). Es wurden jedoch keine Foci von den beiden Fragmenten verursacht. Weder A-6,0 noch A-10,7 können also NIH 3T3 Zellen maligne transformieren.

Dieses negative Ergebnis schließt jedoch nicht aus, daß A-10,7 und A-6,0 doch onkogenes Potential haben, denn nicht alle Onkogene können NIH 3T3 Zellen maligne transformieren. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß in einem (oder beiden) Insert(s) durch die Hind III Klonierung Onkogene in der flankierenden, humanen DNA entweder nicht mitkloniert oder gespalten wurden und im letzteren Fall somit teilweise erhalten, aber nicht mehr funktionsfähig sind.

## 2.4 Hybridisierung mit Onkogenen

Trotz nichterfolgter Transformation von NIH 3T3 Zellen besteht die Möglichkeit, daß in der humanen, flankierenden DNA von A-10,7 und A-6,0 Sequenzen zellulärer Onkogene enthalten sind.

Um dies zu überprüfen, wurden neun Nitrozellulosefilter hergestellt (siehe Methoden, Tüpfeltest), auf denen sich jeweils 1 ng von A-6,0, A-10,7 und - als Positivkontrolle - eines klonierten Onkogens befanden. Die folgenden neun onkogen-enthaltenden Plasmide wurden dafür verwendet: pMCO (v-myc, Lautenberger et al., 1981), pHax4 (v-myb, Perbal et al., 1982), pSRA-2 (v-src, DeLorbe et al., 1980), pAE11 (v-erb, Vennström et al., 1980), pFeSV (v-fes, Sherr et al., 1980), p640 (c-ras<sup>Ki</sup>, McCoy et al., 1983), HB11 (v-ras<sup>Ha</sup>, DeFeo et al., 1981), pABL (v-abl, Wang et al., 1983a), pC14 (v-sis, Gelmann et al., 1982). Daraufhin wurde jeder der Filter mit dem entsprechenden, <sup>32</sup>P-markierten onkogen-enthaltenden Plasmid hybridisiert. Wie Abb. 17 zeigt, ist außer bei den Positiv-Kontrollen keine Hybridisierung festzustellen. Demnach sind keine Sequenzen dieser neun Onkogene in den beiden Fragmenten enthalten. Es verbleibt jedoch die Möglichkeit, daß sich Sequenzen anderer Onkogene (bisher sind ca. 20 bekannt) in den Inserts befinden.

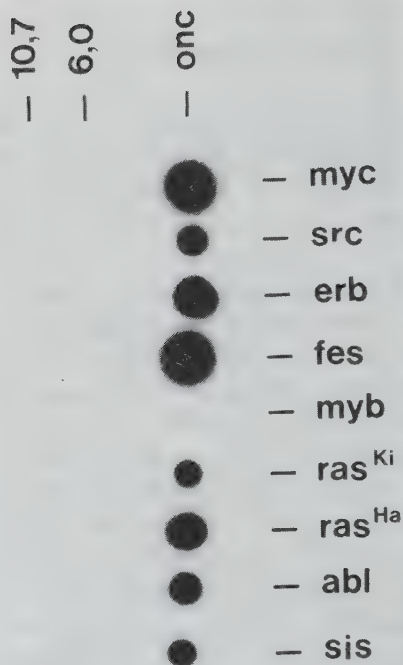


Abb. 17

Hybridisierung mit klonierten Onkogenen.

Auf neun gleichgroßen Nitrozellulosefiltern wurden jeweils 1 ng A-10,7 DNA, 1 ng A-6,0 DNA und als Positivkontrolle 1 ng eines Plasmids, das ein kloniertes onc-Gen enthält (siehe unten), aufgetüpfelt. Von oben nach unten wurden dafür die folgenden Plasmide verwendet (siehe auch laufender Text): pMCO (enthält das klonierte Onkogen v-myc), pSRA-2 (v-src), pAE11 (v-erb), pFeSV (v-fes), pHax4 (v-myb), p640 (c-ras<sup>Ki</sup>), HB11 (v-ras<sup>Ha</sup>), pABL (v-abl) und pC14 (v-sis). Nach Festbacken der DNAs wurde jeder Filter mit dem entsprechenden <sup>32</sup>P markierten Plasmid hybridisiert. Die unterschiedlich starken Hybridisierungssignale sind auf verschiedene spezifische Aktivitäten sowie verschiedene Mengen <sup>32</sup>P-markierter DNA in den Hybridisierungen zurückzuführen.

## 2.4 Translation und Transkription viraler Gene

### 2.4.1 Test auf Expression von HBsAg und HBc/HBeAg

Die Restriktionskarten legen nahe, daß das HBsAg- und HBcAg-Gen in A-6,0 und das HBsAg-Gen in A-10,7 funktionsfähig sind (Abb. 18). Um dies zu überprüfen, wurden pAl 6,0 und pAl 10,7 mit Hind III verdaut und jeweils 5 µg zusammen mit 25 ng pAGO-DNA (Colbere-Garapin et al., 1979), welches das Thymidin Kinasegen (tk) aus Herpes Simplex Virus enthält, mittels der Calcium-Phosphat Methode in Maus Ltk<sup>-</sup> Zellen eingeschleust. Anschließend wurde in HAT Medium zunächst auf stabile Integration des tk Gens selektioniert, um dann in tk-positiven Zellen die Expression der genannten Gene auszutesten.

Die HAT Selektion beruht auf folgenden biochemischen Grundlagen: Ltk<sup>-</sup> Zellen sterben in HAT-Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. Aminopterin hemmt die Dihydrofolatreduktase und damit die Pyrimidin- (Methylierung von dUMP zu dTMP) und Purinsynthese (Formylierung von 5-Amino-Imidazol-4-Carboxamid-Ribonukleotid, einem Vorläufer von IMP). Durch Zugabe von Hypoxanthin wird die Hemmung der Purinsynthese umgangen, da aus Hypoxanthin nun direkt IMP gebildet werden kann. Die Hemmung der Pyrimidinsynthese kann durch die Ausweichreaktion

Thymidin Kinase

Thymidin -----> dTMP

aufgehoben werden. Da Thymidin in HAT Medium enthalten ist, wird zum Überleben der Zellen nur noch Thymidin Kinase benötigt, die durch Aufnahme und Integration des tk-Gens beigesteuert wird. Bei hohem Überschuß von pAl 10,7, bzw. pAl 6,0 gegenüber pAGO ist zu erwarten, daß tk-positive

Zellkolonien sehr häufig auch pAl 10,7 oder pAl 6,0 DNA integriert enthalten (vergleiche Wigler et al., 1977).

Es wurden ca. 1,6 Kolonien pro ng pAGO-DNA erzielt. 14-17 Tage nach der Transfektion wurden Einzelkolonien mit Klonierungszylindern isoliert und in Kulturschalen (Costar) übertragen. Nachdem konfluente Zellrasen entstanden waren, wurden die Überstände mit einem Radioimmunassay (RIA; Ausria II-25, Abbott) auf Anwesenheit von HBsAg geprüft. In Tabelle IV ist eine RIA Analyse der isolierten Kolonien vorgestellt. Dabei sind Werte von  $P/N \geq 2,1$  ( $P/N$ =erzielter Wert dividiert durch den Wert der Negativkontrolle) als positiv zu deuten.

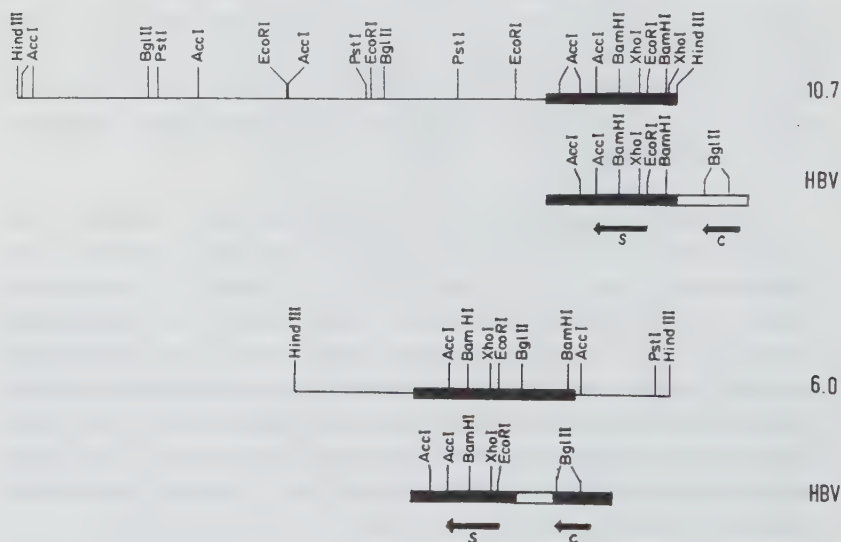


Abb. 18

Positionen des S- und C-Gens in A-10,7 und A-6,0.

Die Restriktionskarten von A-10,7 und A-6,0 sind jeweils mit der von HBV-DNA (Subtyp ayw) gegenübergestellt. Schwarze Balken bedeuten HBV-DNA, welche in den klonierten Sequenzen enthalten ist, weiße Balken stellen fehlende Sequenzen dar. Striche stellen humane DNA dar. Zusätzlich sind die Positionen des S- und C-Gens angegeben.

Tabelle IV

|             | <u>pAl 10,7</u> | <u>pAl 6,0</u> |
|-------------|-----------------|----------------|
| Klon        | P/N             | P/N            |
| 1           | 44,8            | -              |
| 2           | 179             | -              |
| 3           | 40,2            | -              |
| 4           | 639             | -              |
| 5           | 391             | -              |
| 6           | 6,1             | -              |
| 7           | 2,2             | -              |
| 8           | 157             | -              |
| 9           |                 | -              |
| 10          |                 | -              |
| 11          |                 | -              |
| 12          |                 | -              |
| 13          |                 | -              |
| Mittelwert: | 182,4           | -              |

Tabelle IV

HBsAg Expression von Ltk Zellen nach Einschleusung von pAl 10,7 und pAl 6,0 DNA.

In Maus Ltk<sup>-</sup> Zellen wurden je 5 ug Hind III verdaute pAl 10,7 und pAl 6,0 DNA zusammen mit 25 ng pAGO DNA (enthält das HSV tk Gen) eingeschleust. In HAT Medium selektionierte Zellkolonien wurden nach 14-17 Tagen in Costar Platten überführt. Nachdem konfluente Zellrasen (ca.  $10^5$  Zellen) entstanden waren, wurden jeweils 200 ul eines Überstandes (1 ml) von 48 h mit dem Ausria Test (Ausria II, Abbott) auf Anwesenheit von HBsAg untersucht. Die Ergebnisse sind in P/N (erzielter Wert dividiert durch den Wert der Negativkontrolle) angegeben. Werte von  $P/N > 2,1$  sind positiv. Werte von  $P/N < 2,1$  sind als negativ (-) angegeben. Überstände, deren

P/N Werte 30 überschritten, wurden für die Messung verdünnt und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, da in diesem Test der cpm Anstieg in Abhängigkeit von der HBsAg Menge nur bis  $P/N = 30$  linear ist (nicht gezeigt). Am Fuß der Tabelle sind die Mittelwerte aller Zellklone (inklusive der negativen) angegeben.

- - -

pAl 10,7 führt also eindeutig in Ltk-Zellen zur Expression von HBsAg. Dies beweist die strukturelle Integrität des S-Gens in A-10,7. Alle untersuchten Kolonien waren HBsAg positiv, welches zu erwarten war, da sich pAl 10,7 in einem 70-fachen molaren Überschuß über pAGO befand. Die Höhe der HBsAg Expression war allerdings in verschiedenen Zellklonen sehr unterschiedlich. Dafür ist vermutlich eine Kombination verschiedener Faktoren verantwortlich: unterschiedliche Menge integrierter DNA, Intaktheit der A-10,7 Sequenzen, Einfluß flankierender Ltk-DNA (z. B. Ltk-Promotor, -terminationssignal, -enhancer) und Chromatin Struktur.

pAl 6,0 ergab keine HBsAg positiven Kolonien (0/13). Um zu überprüfen, ob überhaupt pAl 6,0 DNA aufgenommen worden war, wurde DNA aus vier pAl 6,0 Ltk<sup>+</sup> Zellklonen (1-4) und zwei pAl 10,7 Zellklonen (4, 5) isoliert und im Tüpfeltest analysiert (Abb. 19). Nach Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-HBV-DNA zeigte der Vergleich mit PLC/PRF/5 DNA, daß in den pAl 10,7 und pAl 6,0 Zellklonen größere Mengen - ca. 10 - 20 Kopien - vorhanden sind. In diesem Versuch wurde die Anwesenheit, nicht aber die Organisation der aufgenommenen DNA untersucht; also ist kein direkter Beweis für die Intaktheit der pAl 6,0 Sequenzen geführt. Dennoch sollten, wie auch bei pAl 10,7, bei der hohen Zahl integrierter Kopien HBsAg-positive Kolonien entstehen, falls das S-Gen intakt ist. Daraus folgt, daß das S-Gen in A-6,0 nicht funktionsfä-

hig ist.

Die Überstände konfluenter Zellrasen der im Tüpfeltest analysierten vier pAl 6,0 Zellklone wurden mit dem Abbott HBe Test auf Anwesenheit von HBc/HBeAg (beide werden erkannt) untersucht und ergaben negative Ergebnisse. Dies legt nahe, daß auch das C-Gen in A-6,0 nicht funktionsfähig ist. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß aufgrund der weiter oben (S. 58) erwähnten Deletion des C-Gen Stopkodons in A-6,0 ein längeres Protein translatiert wird, welches nicht mit HBc/HBe Antikörpern reagiert.

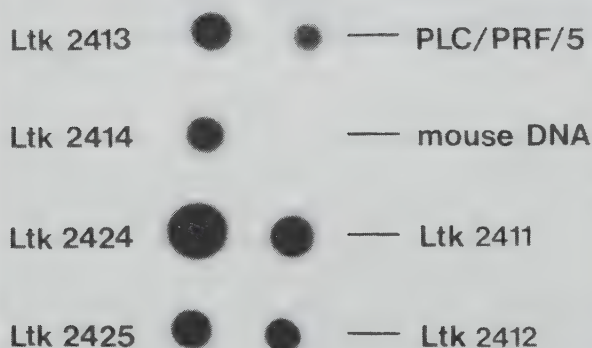


Abb. 19

Tüpfeltest transfizierter Ltk Zellen.

Jeweils 20 ug von DNA aus Ltk Zellklonen, die aus einer Transfektion mit pAl 6,0 DNA (Ltk 2411, 2412, 2413, 2414; vergl. Klone 1, 2, 3, und 4 in Tabelle IV) oder pAl 10,7 DNA (Ltk 2424, 2425; vergl. Klone 4 und 5 in Tabelle IV) hervorgingen, wurden auf einen Nitrozellulosefilter aufgetüpfelt und mit  $^{32}\text{p}$ -HBV-DNA (spez. Akt.= $4,1 \times 10^8$ ) hybridisiert. Als Kontrollen fungierte DNA aus Maus NIH 3T3 Zellen und PLC/PRF/5 Zellen.

#### 2.4.2 Die Zelllinie Ltk 2425

Um die HBsAg Expression näher zu charakterisieren, wurde ein Zellklon ausgewählt, der besonders hohe Mengen an HBsAg exprimiert (Ltk 2425 Zellen = Klon 5, siehe Tabelle IV). In einer Produktionskinetik (Abb. 20) wurde die Expression über einen Zeitraum von 8 Tagen durch RIA gemessen. Während dieser Zeit wurde das Nährmedium nicht ausgewechselt. In den ersten drei Tagen akkumulierte HBsAg schnell im Zellüberstand. Später, als die Zellen aufgrund verbrauchter Nährstoffe zu sterben begannen, stieg die HBsAg Produktion langsamer an. In einem parallel ausgeführten Versuch wurde das Medium alle 24 h erneuert (Abb. 21): die Expression erreichte nach vier Tagen ein Plateau, das bis zum letzten Tag beibehalten wurde. Die sezernierte Menge an HBsAg konnte mittels eines HBsAg-Standards (erhalten vom Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt) quantifiziert werden: Ltk 2425 Zellen sezernierten bis zu  $1,2 \text{ ug HBsAg}/10^7 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$  oder  $185 \text{ ng/ml/Tag}$  (Tag 5, Abb. 21).

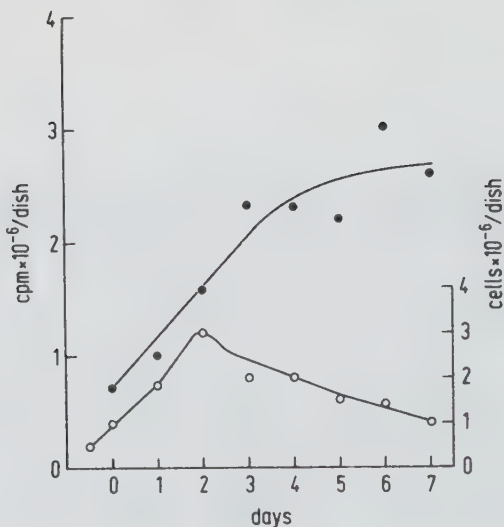


Abb. 20

Produktionskinetik von Ltk 2425 Zellen.

Je  $5 \times 10^5$  Ltk 2425 Zellen wurden auf Petrischalen (Durchmesser=3 cm) ausgesät. 12 h später und anschließend alle 24 h wurden die Zellen gezählt und die sezernierte HBsAg Menge durch RIA bestimmt. Das Nährmedium wurde in diesem Versuch nicht gewechselt. Geschlossene Kreise geben die durch RIA ermittelte cpm Gesamtmenge (in Millionen) pro Petrischale an. Offene Kreise repräsentieren die Zellzahl (in Millionen) pro Petrischale.

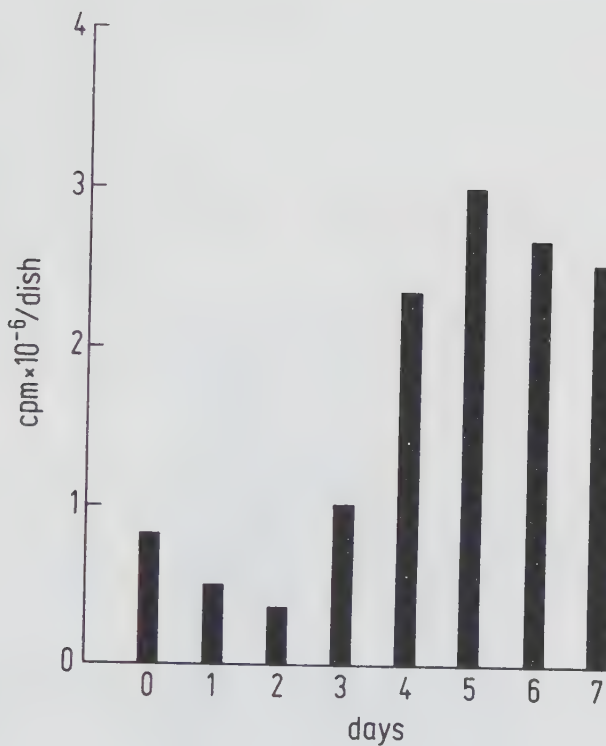


Abb. 21

Produktionskinetik von Ltk 2425 Zellen.

Die hier gezeigte Produktionskinetik von Ltk 2425 Zellen unterscheidet sich von der in Abb. 20 abgebildeten nur dadurch, daß die Zellzahl nicht bestimmt wurde und das Nährmedium alle 24 h ausgetauscht wurde.

Die Expression von HBsAg war auch in DME-Medium ohne HAT, d.h. ohne Selektionsdruck, über zwei Monate stabil: Ltk 2425 Zellen wurden mit, bzw. ohne HAT im Medium gezüchtet und ihre Überstände regelmäßig durch RIA untersucht. Es gab dabei keine nennenswerten Unterschiede (nicht gezeigt).

Um Aufschluß über Menge und Zustand der aufgenommenen A-10,7 DNA zu erhalten, wurde Ltk 2425 DNA im Tüpfeltest analysiert (Abb. 19). Bei einer Quantifizierung der gebundenen  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA ergab sich, daß Ltk 2425 Zellen (90,4 cpm) ca. 12 Kopien von A-10,7 DNA enthalten. Dies wurde durch Vergleich mit PLC/PRF/5 DNA (49,3 cpm, ca. 6 Kopien pro Zelle) und Ltk<sup>-</sup> DNA als Negativkontrolle (8,2 cpm) ermittelt.

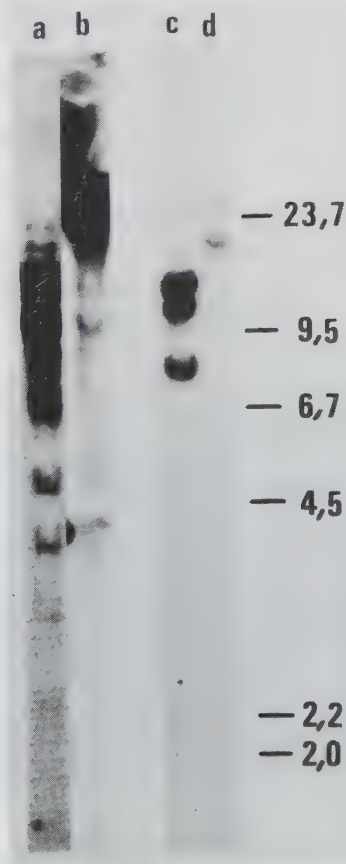
In einer Southern Analyse zeigte Hind III gespaltene und mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisierte Ltk 2425 DNA zwar hauptsächlich Fragmente von über 10,7 kb Größe, jedoch auch einige kleinere Stücke (Abb. 22b). Zur Transfektion war das 10,7 kb Fragment (bzw. Hind III gespaltene pA1 10,7 DNA) verwendet worden, welches keine Hind III Stellen besitzt. Die kleineren Fragmente in Ltk 2425 DNA lassen sich durch Strangbrüche und Endmodifikationen von A-10,7 erklären, die zwischen Transfektion und stabiler Integration aufgetreten sind (Wake et al., 1983)

Auch in der DNA eines anderen Zellklons (Ltk 2511), der ebenfalls integrierte A-10,7 DNA enthält, wurden nach Hind III Spaltung neben vielen größeren auch kleinere Fragmente als 10,7 kb beobachtet (Abb. 22a). In der DNA von Ltk 2511 Zellen (Abb. 22c) sind drei Kopien des tk-Gens integriert (zwei in Ltk 2425 DNA, Abb. 22d), welches keine Hind III Stelle besitzt. Dies ist an den drei, bzw. zwei mit tk-DNA hybridisierenden Fragmenten in Hind III verdauter DNA zu erkennen.

Abb. 22

Southern Analyse transfizierter Ltk Zellen.

10 ug DNA aus Ltk 2511 (a,c) und Ltk 2425 (b,d) Zellen wurden mit Hind III verdaut und auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt. Nach Übertragung auf Nitrozellulose wurde mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA (a,b) und einem 2,0 kb Eco RI-Eco RI Fragment aus dem Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Gen hybridisiert (Spezifische Aktivitäten= $3-5 \times 10^8$  cpm/ug). Rechts im Bild sind die Bandenpositionen (in kb) des Lambdamarkers angegeben.



### 2.4.3 Eigenschaften des sezernierten HBsAg

Der Überstand von Ltk 2425 Zellen wurde bei 15000 g für 24 h zentrifugiert, der Niederschlag in DME-Medium aufgenommen und anschließend in einem CsCl Dichtegradienten zentrifugiert. Als die Fraktionen auf Anwesenheit von HBsAg analysiert wurden, lag der höchste Wert bei einer Dichte von 1,21 g/ml (Abb. 23). Dies ist typisch für die auch in humanem Serum vorhandenen 22 nm HBsAg-Partikel (Gerin et al., 1969). Kugelförmige Partikel von 20-25 nm konnten nach weiterer Reinigung durch einen zweiten CsCl Gradienten und eine Fällung mit 10% Polyäthylenglycol 6000 im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden (Abb. 24).

#### Abb. 23

CsCl Dichtegradientenzentrifugierung des von Ltk 2425 Zellen sezernierten HBsAg (Seite 87).

Fraktionen aus einer CsCl Dichtegradientenzentrifugierung von Ltk 2425 Überständen wurden mittels RIA auf HBsAg untersucht. Offene Kreise geben die Schwebedichte, geschlossene Kreise die durch RIA ermittelten cpm Werte der um den Faktor 100 verdünnten Proben an.

#### Abb. 24

Elektronenmikroskopische Aufnahme von HBsAg Partikeln (Seite 86).

Der Überstand von Ltk 2425 Zellen wurde zwei CsCl Dichtegradientenzentrifugierungen unterzogen und darauf mit 10% Polyäthylenglycol 6000 gefällt. Nach Kontrastierung mit 2% Uranylformiat konnten 20-25 nm Partikel im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden.

Abb. 23

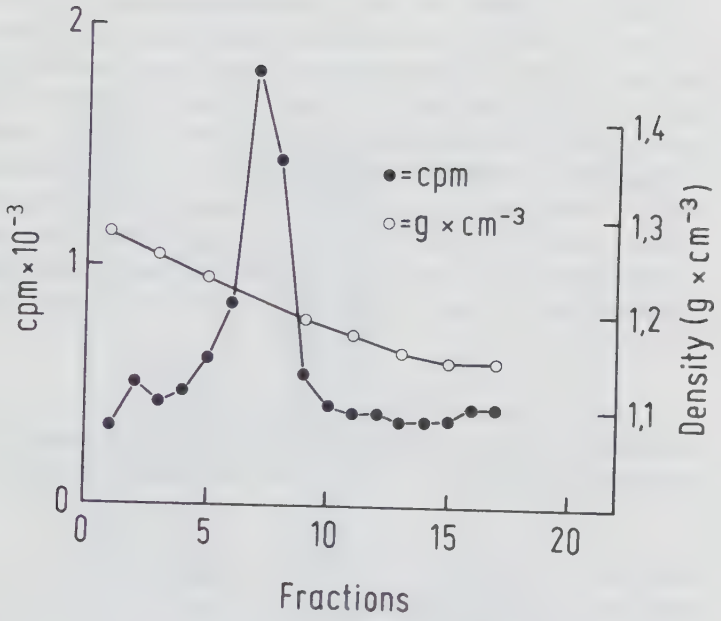
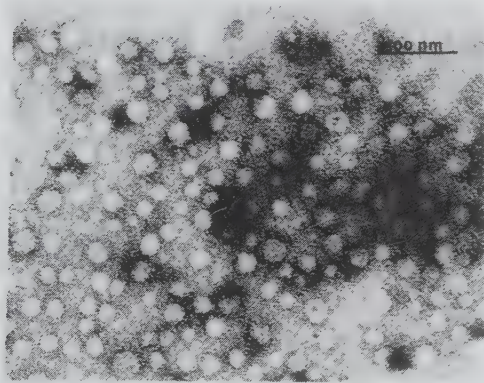


Abb. 24



<sup>35</sup>S-markierte, von Ltk 2425 Zellen sezernierte Polypeptide wurden mit 10% Polyäthylenglycol 6000 gefällt und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Es traten dabei zwei Banden bei 24000 d und 28000 d auf, die gut mit den Größen von P1 (25400 d) und P2 (29000 d, siehe Einleitung) übereinstimmen (Abb. 25a). Auch nach einer Immunpräzipitation mit einem humanen, anti-HBs-enthaltenden Serum (erhalten vom Max-von-Pettenkofer-Institut) waren diese beiden Banden sichtbar (Abb. 25b). Da P2 die glykosylierte Form von P1 ist, legt die Bande bei 28000 d in Ltk 2425 Zellen nahe, daß auch hier eine Glykosylierung erfolgt.

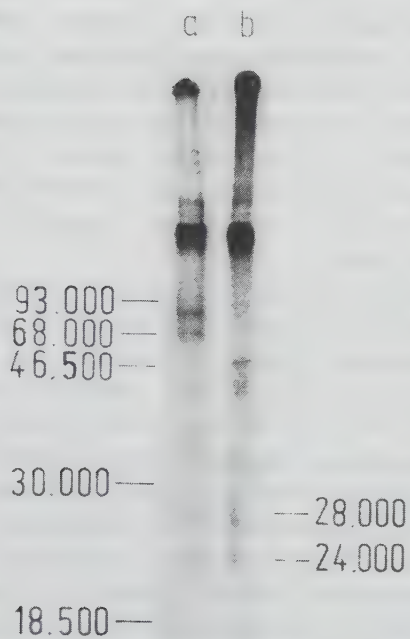
In allen Untersuchungen unterschied sich das von Ltk 2425 Zellen sezernierte HBsAg in keiner Weise von HBsAg, das von humanen Hepatozyten bei einer HBV Infektion exprimiert wird.

#### Abb. 25

Elektrophoretische Auftrennung von HBsAg Polypeptiden aus Ltk 2425 Zellen (Seite 89)

Ltk 2425 Zellen wurden in einer zu 80% konfluenten T75 Roux Flasche für 24 h in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Cys gezüchtet, der Überstand (10 ml) mit PEG 6000 gefällt und die Polypeptide in einem 12,5 prozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Spur a). Die gleiche Probe wurde mit 10 ul eines anti-HBs enthaltenden Humanserums immunpräzipitiert und auf dem gleichen Gel aufgetrennt (Spur b). Die Positionen von HBsAg (P1 ≈ 24000, P2 ≈ 28000) sind rechts, die Positionen der <sup>14</sup>C-markierten Markerproteine auf der linken Seite angegeben.

Abb. 25



#### 2.4.4. Vergleichende Expressionsstudien

##### 2.4.4.1 Vergleich von A-10,7 mit HBV-DNA

Die HBsAg Expression von A-10,7 (vergl. Tabelle IV und Abb. 20, 21) ist wesentlich höher als Werte mit klonierter HBV-DNA, die unter vergleichbaren Bedingungen in unserem Labor erzielt wurden (U. Engelhardt, pers. Mitteilung). Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurden unter gleichen Versuchsbedingungen A-10,7 DNA und HBV-DNA in Ltk-Zellen eingeschleust und die Höhe der resultierenden HBsAg Expression verglichen.

Für den Versuch wurden die Plasmide pAl 10,7 und pKK HBs 34 verwendet, wobei letzteres mit dem 2,8 kb Bgl II-Bgl II HBV-Fragment ein funktionsfähiges S-Gen enthält (Wang et al., 1982). Für einen gültigen Vergleich mußte in beiden Fällen die S-Gen-enthaltende Plasmid DNA linear vorliegen, denn sonst wäre die Möglichkeit, daß das S-Gen bei der zur Integration erforderlichen Öffnung des Plasmids zerstört würde, bei unterschiedlich langen Plasmiden verschieden groß. Zudem sollten in der linearisierten DNA möglichst lange Enden an beiden Seiten des S-Gens gegen einen Angriff zellulärer Nukleasen schützen. Also wurde pKK HBs 34 DNA mit Hind III verdaut, das nur eine Schnittstelle, und zwar in der Plasmid-DNA, besitzt. pAl 10,7 wurde ebenfalls mit Hind III gespalten, wodurch das 10,7 kb Insert freigesetzt wird. Gleiche molare Mengen der beiden verdauten Plasmide pAl 10,7 wurden zusammen mit pAGO DNA in Ltk<sup>-</sup> Zellen eingeschleust, Kolonien isoliert und die HBsAg Expression aus den Überständen konfluenter Zellrasen gemessen.

Wie auch in der ersten Transfektion mit pAl 10,7 DNA (Tabelle IV), exprimierten die Zellkolonien sehr unterschiedliche Mengen an HBsAg; diesmal gab es auch einige

HBsAg-negative Kolonien. Ein aussagekräftiger Vergleich der beiden Plasmide kann daher nicht durch Gegenüberstellung der Ergebnisse mit einzelnen Zellkolonien, sondern nur durch Ermittlung des Durchschnitts der Werte aller erhaltenen Kolonien gezogen werden. Die durchschnittliche HBsAg Expression pAl 10,7 - enthaltender Zellklone (P/N=128) lag dabei um einen Faktor von 33 höher als die pKK HBs 34 enthaltender Zellklone (P/N=3,8; siehe Tabelle V).

Tabelle V

|      | <u>pAl10,7</u> | <u>pKK HBs 34</u> | <u>pAl10,7(RI-HIII)</u> | <u>PstI-HindIII</u> |
|------|----------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| Klon | P/N            | P/N               | P/N                     | P/N                 |
| 1    | 445            | -                 | 213                     | -                   |
| 2    | 407            | 2,2               | 27,6                    | 104                 |
| 3    | 33,1           | -                 | 18,4                    | 7,7                 |
| 4    | 8,3            | 2,1               | 16,2                    | 9,0                 |
| 5    | -              | -                 | 9,3                     | 5,0                 |
| 6    | -              | 11,5              | 2,6                     | 91                  |
| 7    | -              | -                 | 97                      | 32                  |
| 8    |                | 6,5               | 2,5                     | 53                  |
| 9    |                | 21,8              | 27,2                    | 440                 |
| 10   |                | -                 | 544                     |                     |
| 11   |                | -                 | 97                      |                     |
| 12   |                | -                 | -                       |                     |
| 13   |                | -                 | 454                     |                     |
| 14   |                | -                 | 10,3                    |                     |
| 15   |                | -                 |                         |                     |
| 16   |                | -                 |                         |                     |
| MW : | 128            | 3,8               | 108,6                   | 82,6                |

## Tabelle V

Vergleich der HBsAg Expression von pKK HBs 34, pAl 10,7 und zweier Subfragmente von pAl 10,7 (Seite 91).

Gleiche molare Mengen der im Text beschriebenen Plasmide pAl 10,7 (5 ug), pKK HBs 34 (2,8 ug) und pAl 10,7 (RI-HIII; siehe Seite 98) (1,9 ug) sowie des Pst I A Fragments aus A-10,7 (Pst I - Hind III; Seite 98; 1,3 ug) wurden zusammen mit 50 ng pAGO DNA in Ltk<sup>-</sup> Zellen eingeschleust. Anschließend wurde im Prinzip verfahren, wie in Tabelle IV beschrieben. MW bedeutet Mittelwert.

- - -

#### 2.4.4.2 Kartierung der für die hohe Expression verantwortlichen DNA Region

Es erhebt sich die Frage, ob in A-10,7 eventuell die humanen Sequenzen für die hohe HBsAg Expression verantwortlich sind. Für eine Beantwortung dieser Frage erwies sich ein DNA Fragment (A-10,5) als nützlich, das von S. Koch ebenfalls aus PLC/PRF/5 Zellen isoliert worden war (Koshy et al., 1983). Wie die Abb. 26 zeigt, ist die Restriktionskarte des HBV Anteils von A-10,5 mit der des HBV Anteils von A-10,7 identisch. Partielle Nukleotidsequenzierung durch S. Koch hatte ebenfalls gezeigt, daß die in beiden Inserts sequenzierten HBV Bereiche (insgesamt ca. 300 bp) identisch sind.

Ferner sind die unmittelbar an die virale DNA angrenzenden humanen Sequenzen ebenfalls in beiden Inserts identisch (89 bp wurden in beiden Inserts sequenziert). Weiter entfernt liegende humane DNA weist jedoch keine Gemeinsamkeiten auf, wie die völlig verschiedenen Restriktionsmuster zeigen (Abb. 26). Also endet die Gemeinsamkeit von A-10,7 und 10,5 in einem Bereich von ca. 400 bp zwischen dem Ende der 89 sequenzierten, in beiden

Inserts identischen Nukleotide in humaner DNA und der ersten unterschiedlichen Restriktionsstelle (Eco RI Stelle in A-10,7).

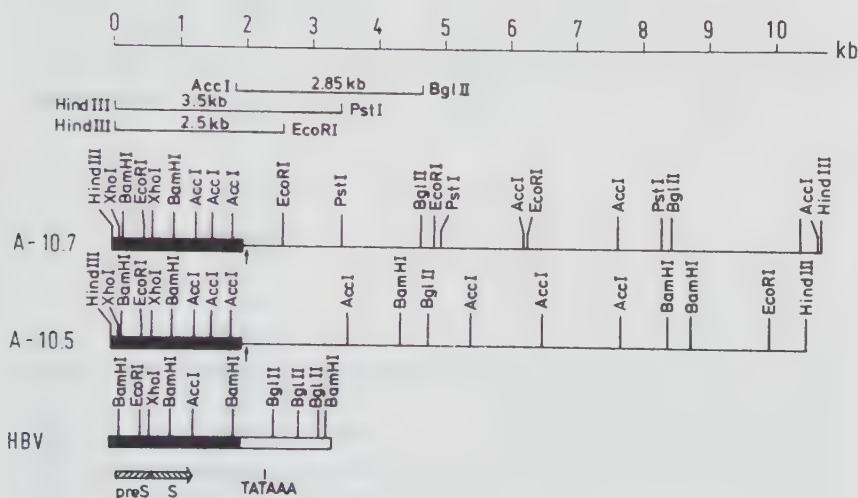


Abb. 26

Vergleich der Restriktionskarten von A-10,7 und A-10,5.

Die Restriktionskarten der HBV-spezifischen 10,7 und 10,5 kb Fragmente aus PLC/PRF/5 Zellen sind einander gegenübergestellt (in umgekehrter Orientierung wie in Abb. 15 und 18). Schwarze Balken repräsentieren HBV Sequenzen, dünne Striche humane DNA (siehe auch Koshy et al., 1983). Ferner ist eine Restriktionskarte von HBV DNA (Subtyp ayw) gezeigt, wobei der weiße Balken Sequenzen darstellt, die nicht in A-10,7 und A-10,5 vorhanden sind. "TATAAA" gibt die Position des Poly(A) Signals des S-Gens an. Oben im Bild sind drei Subfragmente von A-10,7 dargestellt, die im Text erwähnt sind: Hind III-Eco RI und Hind III-Pst I siehe Seite 98, Acc I-Bgl II siehe Seite 99.

Da sich A-10,7 und A-10,5 nur in ihrem humanen Sequenzanteil unterscheiden (mit der Einschränkung, daß die HBV Sequenzen beider Inserts nicht vollständig sequenziert wurden), sollte die HBsAg Expression beider Inserts unterschiedlich sein, falls sie tatsächlich durch humane Sequenzen beeinflusst werden. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden je 5 ug von Lambda A1 10,7 und Lambda A1 10,5 zusammen mit pAGO DNA in Ltk-Zellen eingeschleust (Tabelle VI).

#### Tabelle VI

Vergleich der HBsAg Expression von Lambda A1 10,7 und Lambda A1 10,5 (Seite 95).

Jeweils 5 ug von Lambda A1 10,7 und Lambda A1 10,5 DNA wurden mit 50 ng pAGO DNA in Ltk<sup>-</sup> Zellen eingeschleust und anschließend verfahren, wie in Tabelle IV beschrieben. Die 24 h Überstände konfluenter Zellrasen der isolierten Ltk<sup>+</sup> Kolonien wurden mittels RIA auf HBsAg untersucht. MW steht für Mittelwert.

Tabelle VI

|      | <u>Lambda Al 10,7</u> | <u>Lambda Al 10,5</u> |
|------|-----------------------|-----------------------|
| Klon | P/N                   | P/N                   |
| 1    | -                     | 10,6                  |
| 2    | 2,1                   | 6,2                   |
| 3    | 12,3                  | 11,6                  |
| 4    | -                     | -                     |
| 5    | 114,1                 | -                     |
| 6    | 65,2                  | -                     |
| 7    | 3,1                   | (2,0)                 |
| 8    | 5,5                   | 2,4                   |
| 9    | 140,2                 | -                     |
| 10   | 15,8                  | -                     |
| 11   | 8,3                   | -                     |
| 12   | 9,5                   | -                     |
| 13   | 28,6                  |                       |
| 14   | 15,1                  |                       |
| 15   | 24,2                  |                       |
| 16   | 14,9                  |                       |
| 17   | 30,9                  |                       |
| 18   | 23,7                  |                       |
| MW : | 28,7                  | 3,6                   |

Die durchschnittliche HBsAg Expression der Lambda Al-10,7 DNA lag um ca. eine Größenordnung höher (Faktor 8) als die von Lambda Al 10,5 DNA. Um zu untersuchen, ob dies auf eine unterschiedliche Zahl von Genkopien zurückzuführen ist, wurden die Lambda Al 10,7 Zellkolonien 5, 6, 13, 14 und 16 sowie Lambda Al 10,5 Zellkolonien 1, 2, 3, 7 und 8 als Massenkulturen gezüchtet, die sezernierte HBsAg Menge durch RIA gemessen und jeweils die Zellzahl bestimmt. Außerdem wurde aus allen Zellen DNA isoliert und in einem Tüpfeltest

der HBV-spezifische DNA-Anteil annähernd quantitativ bestimmt. In Abb. 27 ist ersichtlich, daß die untersuchten Lambda Al 10,7 und Lambda Al 10,5 Zellkolonien etwa gleiche Mengen an HBV-DNA enthalten (im Vergleich mit PLC/PRF/5 DNA ca. 1-3 Kopien pro Zelle). In Tabelle VII ist dagegen deutlich, daß die durchschnittliche HBsAg Expression der Lambda Al 10,7 Zellkolonien um einen Faktor 7,7 höher liegt als die der Lambda Al 10,5 Kolonien.

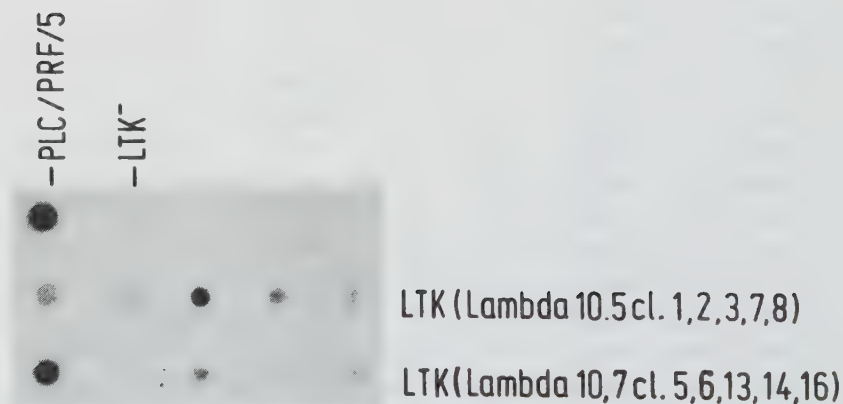


Abb. 27

#### Tüpfeltest transfizierter Ltk-Zellen

Jeweils 10 µg von DNA aus Ltk-Zellklonen, die mit Lambda Al 10,5 DNA (Zellklon 1,2,3,7,8) und Lambda Al 10,7 DNA (Zellklon 5,6,13,14,16) transfiziert worden waren, wurden im Tüpfeltest mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisiert (spez. Akt.= $3,8 \times 10^8$  cpm/µg). Als Positivkontrolle fungierte PLC/PRF/5 DNA, als Negativkontrolle Ltk<sup>-</sup> DNA.

Tabelle VII

| <u>Lambda Al 10,7</u> |        | <u>Lambda Al 10,5</u> |          |
|-----------------------|--------|-----------------------|----------|
| Klon                  | cpm    | Klon                  | cpm      |
| 5                     | 256840 | 1                     | 3050 (-) |
| 6                     | 45160  | 2                     | 6280     |
| 13                    | 148000 | 3                     | 48140    |
| 14                    | 159000 | 7                     | 21040    |
| 16                    | 15580  | 8                     | 2760 (-) |
| MW :                  | 124916 |                       | 16244    |

Tabelle VII

Vergleich der HBsAg Expression von Lambda Al 10,7 und Lambda Al 10,5 Ltk<sup>+</sup> Kolonien nach Zucht als Massenkulturen.

Die Zellklone (siehe Tabelle VI) wurden als Massenkulturen gezüchtet. Die Zellzahl wurde bestimmt und die HBsAg Expression durch RIA gemessen. Die vorgestellten Ergebnisse sind auf cpm/10<sup>7</sup> Zellen/24 h umgerechnet. MW bedeutet Mittelwert.

Der Vergleich mit Tabelle VI zeigt allerdings, daß die HBsAg Expression der einzelnen Zellklone nicht in jedem Fall stabil ist: zwei Zellklone (Lambda Al 10,5-1,8), die zunächst HBsAg positiv waren (Tabelle VI), exprimierten nach Züchtung in Massenkulturen keine messbaren Mengen an HBsAg mehr. Auch die relative Höhe der Expression einiger Zellklone hatte sich in einigen Fällen verändert (vergl. Tab. VI und VII). Der Quotient der durchschnittlichen Expression von Lambda Al 10,7 und Lambda Al 10,5 Kolonien (Tabelle VI: P/N = 8, Tabelle VII: P/N = 7,7) hatte sich jedoch kaum verändert. Aufgrund der hier ersichtlichen Instabilität der Expression integrierter DNA wurden generell Vergleiche zwischen verschiedenen Zellkolonien möglichst bald nach ihrer Isolierung durchgeführt.

Aus dem Ergebnis des Vergleichs zwischen Lambda Al 10,7 und Lambda Al 10,5, deren HBV Anteile nach den vorliegenden Ergebnissen identisch sind, ist zu folgern, daß die für die Höhe der Expression der A-10,7 DNA verantwortliche DNA Region in den flankierenden humanen Sequenzen liegt. Durch sukzessive Reduzierung der Länge der humanen Sequenzen durch Restriktionsspaltung kann nunmehr die für die erhöhte Expression kritische Region der Human DNA bestimmt werden. Hierbei wurde im einzelnen wie folgt vorgegangen.

Aus A-10,7 wurden durch Pst I Verdau ein 3,5 kb Pst I-Hind III Fragment (siehe Abb. 26) und durch partiellen Eco RI Verdau ein 2,5 kb Eco RI-Hind III Fragment (siehe Abb. 26) isoliert, die beide die vollständigen HBV-Sequenzen, aber verschieden lange humane Sequenzen enthalten. Das Eco RI-Hind III Fragment wurde in pBR327 kloniert und pAl 10,7(RI-HIII) benannt. Zur Transfektion wurde dieses Plasmid mit Hind III linearisiert, wodurch hinter den humanen Sequenzen 3,2 kb Plasmid DNA lagen. Wie bereits beschrieben wurden pAl 10,7 und pKK HBs 34 ebenfalls mit Hind III geöffnet. Equimolare Mengen dieser DNAs und des

nicht klonierten Pst I-Hind III Fragments wurden in Ltk-Zellen eingeschleust, Kolonien isoliert und die Höhe der HBsAg Expression bestimmt (Tabelle V). Die durchschnittliche Expression von pAl 10,7(RI-HIII) (P/N = 108,6) und des Pst I-Hind III Fragments (P/N = 82,6) war sehr ähnlich wie die von pAl 10,7 (P/N = 128).

Aus diesem Ergebnis geht hervor, daß die für die erhöhte Expression von A-10,7 kritische DNA Region in einem Eco RI - Hind III Subfragment enthalten ist, daß nur 490 bp flankierender humaner Sequenzen besitzt. Da der zuvor beschriebene Vergleich von Lambda Al 10,7 und Lambda Al 10,5 gezeigt hatte, daß die verantwortliche DNA Region in der flankierenden humanen DNA liegt, und zwar mindestens 89 bp von der Virus-Wirt-Übergangsstelle entfernt (aufgrund der identischen Nukleotidsequenzen in diesem Bereich) ergibt sich nunmehr, daß die für die hohe Expression von A-10,7 maßgebliche DNA Region zwischen 89 bp und 490 bp entfernt von der Virus-Wirt-Übergangsstelle in der humanen DNA liegt.

#### 2.4.4.3 Test auf Enhanceraktivität

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte HBsAg Expression von A-10,7 wäre die Anwesenheit einer Enhancersequenz in der humanen DNA. Am 5' oder 3' Ende eines Gens gelegene Enhancer können die Expression dieses Gens um einen Faktor bis zu zweihundert steigern (Khoury & Gruss, 1983; Übersichtsartikel). Die Orientierung des Enhancers relativ zum Gen ist typischerweise für die Höhe der Expression unerheblich.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde ein Acc I-Bgl II Fragment (siehe Abb. 26) welches die weiter oben beschriebene, für die erhöhte Expression verantwortliche Region enthält, aus A-10,7 durch präparative Agarose-

gel-Elektrophorese isoliert und in ein 2,1 kb Acc I-Bgl II Fragment aus dem Plasmid pKK92c-2, einem Derivat von pBR322, kloniert (Abb. 28). Das entstandene rekombinante Plasmid wurde anschließend mit Bgl II linearisiert und mit einem 3,6 kb langen Bam HI-Bam HI Fragment (aus dem Plasmid pFG5) ligiert, das das Thymidinkinase Gen (tk) aus Herpes Simplex Virus enthält. Bgl II und Bam HI Enden können miteinander ligiert, aber später mit keinem der beiden Enzyme gespalten werden. Es entstanden die beiden Plasmide pF3 und pF8, die das tk Gen in unterschiedlichen Orientierungen relativ zu dem Acc I-Bgl II Fragment aus A-10,7 enthalten.

Die Ligierung einer Enhancersequenz mit dem tk Gen sollte zu einem deutlichen Anstieg tk-positiver Zellkolonien nach Transfektion in tk negative Säugerzellen führen (Hearing et al., 1983; Jolly et al., 1983). Equimolare Mengen von pFG5, pF3 und pF8 wurden in Ltk<sup>-</sup> Zellen eingeschleust; in HAT Medium wurde auf tk positive Zellkolonien selektioniert und nach 14 Tagen die entstandenen Kolonien gezählt (Tabelle VIII). Eindeutig führen alle drei Plasmide zu einer sehr ähnlichen Anzahl tk positiver Kolonien. Durch diesen Versuch kann daher die Anwesenheit einer in Ltk Zellen wirkenden Enhancersequenz im Bgl II-Acc I A Fragment mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

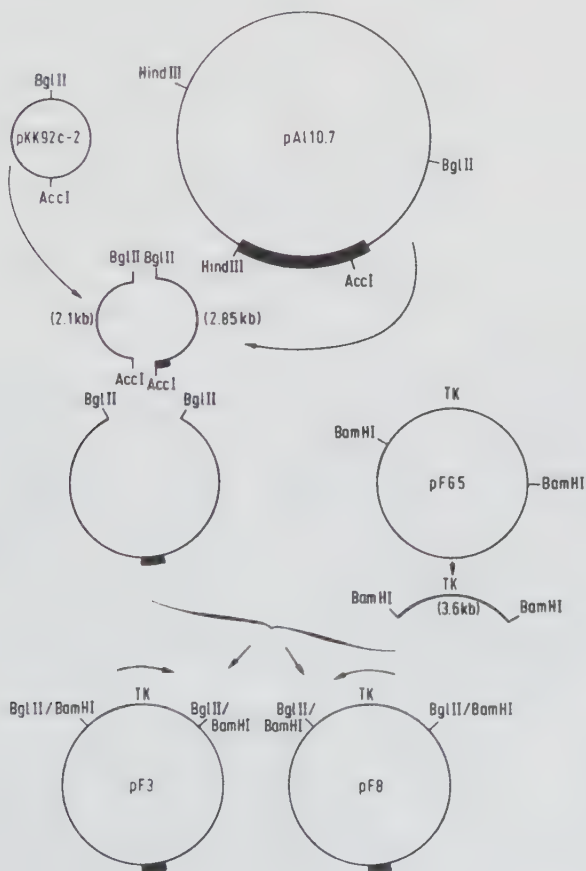
#### Abb. 28

Ligierung eines Subfragments von pA1 10,7 DNA mit tk DNA zum Test auf Enhanceraktivität.

Aus dem Plasmid pKK92c-2 wurde ein Bgl II-Acc I Fragment (2,1 kb) isoliert und mit einem gereinigten 2,85 kb langen Bgl II-Acc-I Fragment aus pA1 10,7 (enthält die für die hohe HBsAg Expression verantwortliche DNA Region, siehe Text) ligiert. Der HBV Anteil ist als schwarzer Balken dargestellt. Das entstandene rekombinante Plasmid (Mitte links) wurde daraufhin mit Bgl II linearisiert. In diese

Restriktionsstelle wurde ein 3,6 kb Bam HI-BamHI Fragment aus pFG5, das das Thymidinkinase Gen aus Herpes Simplex Virus enthält, ligiert, sodaß das tk Gen in beiden Orientierungen relativ zum 10,7 kb Bgl II-Acc I Fragment vorliegt (pF3, pF8).

Abb. 28



| <u>Plasmid DNA</u> | <u>Menge</u> | <u>Kolonienzahl</u> |
|--------------------|--------------|---------------------|
| pFG5               | 20 ng        | 20                  |
|                    | 100 ng       | 117                 |
| pF3                | 21,8 ng      | 28                  |
|                    | 109 ng       | 100                 |
| pF8                | 21,8 ng      | 9                   |
|                    | 109 ng       | 89                  |

Tabelle VIII

Anzahl tk positiver Zellkolonien nach Einschleusung von tk-Plasmiden.

Die in der Tabelle angegeben, equimolaren Mengen der im Text beschriebenen Plasmide pFG5, pF3 und pF8 wurden mittels der Calzium Phosphat Methode unter gleichen Bedingungen in Maus  $Ltk^-$  Zellen eingeschleust und anschließend  $Ltk^+$  Zellen in HAT Medium selektioniert. 14 Tage nach der Transfektion wurden tk positive Zellkolonien gezählt.

#### 2.4.4.4 Charakterisierung der HBsAg mRNA aus Ltk 2425 Zellen

Nachdem eine Enhancerfunktion der flankierenden Human DNA nicht nachgewiesen werden konnte, ist als weitere Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte Expression die Transkription einer mRNA in Betracht zu ziehen, die sich von der viralen HBs-spezifischen mRNA unterscheidet. Durch die Restriktionskarte von A-10,7 war bekannt, daß das Polyadenylierungssignal des S-Gens, welches nach Cattaneo et al. (1983b) 1083 bp vom S-Gen entfernt und im C-Gen liegt, nicht in A-10,7 enthalten ist (siehe Abb. 26). Da die DNA Region, in der sich die Polyadenylierungsstelle befindet, aber für die HBsAg Expression notwendig ist (Pourcel et al., 1982a), erhob sich die Frage, ob das S-Gen Transkript von A-10,7 eine humane Polyadenylierungssequenz enthält. Ein potentielles Polyadenylierungssignal (AATAAA) konnte durch die Sequenzanalyse von S. Koch ca. 440 bp entfernt von der Virus-Wirt-Übergangsstelle in den humanen Sequenzen von A-10,7 lokalisiert werden (Abb. 31). Durch die Anwesenheit humaner Sequenzen bis zu dieser Polyadenylierungssequenz auf der HBsAg mRNA von A-10,7 könnte eine stabilere mRNA entstehen und daher die hohe HBsAg Expression von A-10,7 erklärt werden.

Um die von A-10,7 transkribierte HBsAg mRNA bezüglich der abgelesenen DNA Sequenzen zu kartieren, wurde zunächst aus Ltk 2425 Zellen isolierte Gesamt RNA nach Denaturierung mit Glyoxal auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen ("Northern blot"). Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-HBV-DNA zeigte eine Bande bei 2,2 kb (Abb. 29). Dieses Länge entspricht etwa der in PLC/PRF/5 Zellen nachgewiesenen HBV spezifischen HBsAg mRNA von 2,0 kb (Edman et al., 1980). Nach längerer Exposition werden zusätzliche, höherliegende Banden sichtbar. Es wurde untersucht, ob diese Transkripte lange humane, flankierende

Sequenzen enthalten: da sie aber nicht mit einem 2,35 kb Eco RI-Eco RI Fragment von A-10,7 (Fragment B, siehe Abb. 15) hybridisieren, erfolgt also keine Transkription humaner Sequenzen aus dieser Region. Die hochmolekularen Banden können deshalb als Folge unzureichender RNA Denaturierung erklärt werden, wie sie häufig nach Behandlung mit Glyoxal beobachtet wird.

Zwei verschiedene HBV Sequenzen sind als S-Gen Promotor beschrieben worden: eine TATA Sequenz vor dem preS-Gen (Pourcel et al., 1982a; Gough, 1983; Rall et al., 1983) und eine Sequenz innerhalb des preS Gens, welche der Sequenz des SV40 "late" Promotors sehr ähnelt (Cattaneo et al., 1983b). Die Positionen dieser beiden Signale sind in Abb. 31 dargestellt. Um die von A-10,7 transkribierte HBsAg mRNA zu kartieren, muß nun gezeigt werden, welches dieser beiden Signale als Promotor fungiert. Dies wurde mittels S1 Kartierung (Berk & Sharp, 1978; Weaver & Weissmann, 1979) erreicht. pA1 10,7 wurde mit Acc I verdaut und die überstehenden 5' Enden mit  $^{32}\text{P}$  markiert. Ein 1,9 kb langes Acc I-Acc I Fragment, welches das S-Gen enthält, wurde durch präparative Gelelektrophorese isoliert und mit Sph I verdaut, um ein asymmetrisch markiertes 1,8 kb langes Acc I-Sph I Fragment zu erhalten (siehe Abb. 31). Dieses Fragment wurde nun mit gesamter Ltk 2425 RNA hybridisiert und die entstandenen Hybride daraufhin mit verschiedenen Mengen der einzelstrangspezifischen Nuklease S1 verdaut. Als Negativkontrolle wurde eine gleiche Menge markierter DNA mit tRNA aus Hefe hybridisiert und anschließend mit S1 Nuklease verdaut.

Nach alkalischer Hydrolyse der RNA wurden die vom S1 Verdau geschützten Fragmente auf einem 6% Polyacrylamid Sequenzierungsgel analysiert (Abb. 30 und 31). Es zeigte sich, daß ein Fragment von ca. 846 Basen geschützt worden war. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen von Cattaneo et al.

überein, nach denen in diesem Versuch ein Fragment von 858 Basen geschützt werden sollte. Die Möglichkeit, daß das hier kartierte 5' Ende der HBsAg mRNA nicht das 5' Ende der HBsAg mRNA, sondern eine "splice acceptor" Stelle darstellt, kann durch die Ergebnisse von Cattaneo et al. ausgeschlossen werden. Diese Autoren hatten Hybride nach Verdau mit den Nukleasen S1 und ExoVII verglichen. Im Gegensatz zu S1 spaltet ExoVII nicht den einzelsträngigen DNA "loop" in Hybriden aus DNA und "gesplinter" mRNA. Da beide Nukleasen identische Fragmente ergaben, kann davon ausgegangen werden, daß die HBsAg mRNA nicht "gesplint" ist und daß auch das hier kartierte 5' Ende den echten Start der mRNA darstellt.

Falls die TATA Sequenz der Promotor wäre, sollte in Abb. 30 ein Fragment von 1230 Basen sichtbar sein, was aber nicht der Fall ist. Kleinere Mengen von Transkripten, die von der TATA Sequenz ausgehen, können durch diesen Versuch allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Aus der Länge der HBsAg mRNA (2,2 kb), der Lokalisierung des Promotors und einer angenommenen Länge von 140 Poly(A) Nukleotiden (Littauer & Soreq, 1982) lässt sich die Position des 3' Endes berechnen: ca. 440 bp von der Virus-Wirt Übergangsstelle entfernt in den humanen Sequenzen von A-10,7. Tatsächlich konnte durch Sequenzanalyse von A-10,7 (von S. Koch) in dieser Region (440 bp von der Virus-Wirt Übergangsstelle) ein Poly(A) Signal AATAAA nachgewiesen werden.

Es konnte also gezeigt werden, daß sich die von A-10,7 transkribierte HBsAg mRNA in der Sequenz von der normalen HBV HBsAg mRNA unterscheidet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die verschiedenen Sequenzen am 3' Ende zu mRNAs unterschiedlicher Stabilität führen, was wiederum die unterschiedlich hohe HBsAg Expression der untersuchten HBV-spezifischen DNAs erklären könnte.

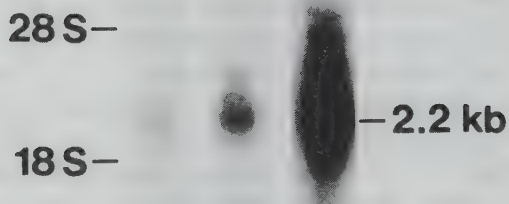


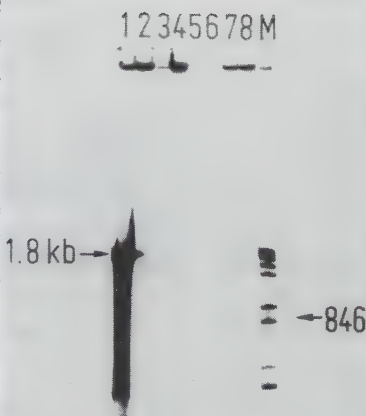
Abb. 29

Northern Analyse HBV-spezifischer mRNA aus Ltk 2425 Zellen. 10 ug RNA aus Ltk 2425 Zellen wurde mit Glyoxal denaturiert, auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen, mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisiert (spez. Akt. =  $4 \times 10^8$  cpm/ug) und autoradiographiert. Von links nach rechts sind die Ergebnisse für Exponierungszeiten von 4 h, 8 h und 48 h gezeigt.

Abb. 30

S1 Nuklease Kartierung des 5' Endes der HBsAg mRNA in Ltk 2425 Zellen (Seite 107). Ein 1,9 kb Acc I-Acc I Subfragment aus pAl 10,7 wurde an den 5' Enden mit  $^{32}\text{P}$  markiert und darauf mit Sph I verdaut, um ein asymmetrisch markiertes 1,8 kb Acc I - Sph I Fragment zu erhalten (siehe

auch Abb. 31). 50000 cpm dieser DNA wurden mit 30 ug gesamter Ltk 2425 RNA oder 30 ug tRNA aus Hefe bei 53°C für 16 h hybridisiert. Die Hybride wurden mit unterschiedlichen Mengen S1 Nuklease bei 37°C für 30 Min. verdaut. Nach alkalischer Hydrolyse der RNA wurden die geschützten Fragmente auf einem sechsprozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Ergebnisse durch Autoradiographie dargestellt. Spur 1: 5' endmarkiertes Acc I-Sph I Fragment (4000 cpm). Spuren 2,3: markierte DNA nach Hybridisierung (ohne RNA) und Verdau mit 10, bzw. 30 Einheiten S1 Nuklease. Spuren 4-6: markierte DNA nach Hybridisierung mit Hefe tRNA und Verdau mit 1, 10 und 30 Einheiten S1 Nuklease. Spuren 7,8: markierte DNA nach Hybridisierung mit Ltk 2425 RNA und Verdau mit 10, bzw. 30 Einheiten S1 Nuklease. M=Marker: Hind III + Eco RI verdaute Lambda DNA + Hpa II verdautes pBR322.



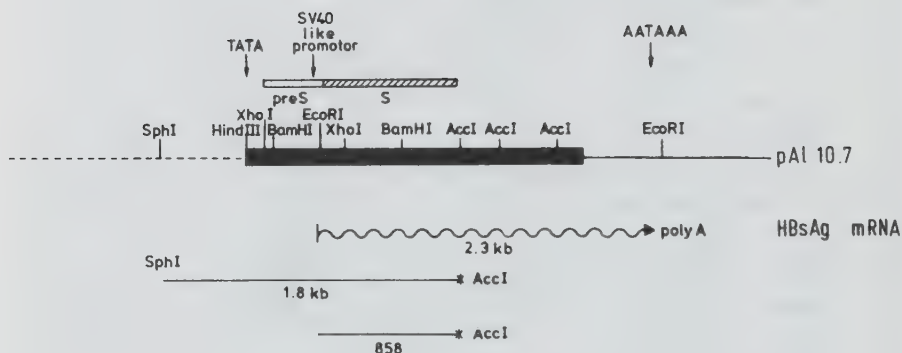


Abb. 31

Kartierung der HBsAg mRNA aus Ltk 2425 Zellen.

Die hier dargestellte Kartierung der HBsAg mRNA fasst die Ergebnisse der S1 Nuklease und Northern Analyse zusammen. Im oberen Bildteil ist pAl 10,7 gezeigt. Der dicke Balken entspricht HBV-DNA, der dünne Strich humaner DNA und die gestrichelte Linie Plasmid DNA. Darüber sind die Positionen des S- und preS-Gens sowie der beiden beschriebenen Promotoren (TATA bzw. "SV40-like promotor") sowie der Poly(A) Sequenz (AATAAA) in humaner, flankierender DNA angegeben. Die Schlangenlinie repräsentiert die HBsAg mRNA. Weiter unten im Bild sind das endmarkierte Acc I-Sph I Fragment, das mit der HBsAg mRNA hybridisiert wurde und das nach S1 Nuklease Verdau geschützte Fragment von 858 Nukleotiden illustriert.

#### 2.4.4.5 Zwischenzusammenfassung

Die Untersuchungen von A-10,7 und A-6,0 auf Expression viraler Antigene ergeben folgendes:

- 1) A-10,7 enthält ein funktionsfähiges S-Gen; A-6,0 besitzt weder ein intaktes S- noch C-Gen.
- 2) Das nach Einschleusung von A-10,7 von Ltk Zellen produzierte HBsAg wird in Form von 20-25 nm Partikeln sezerniert. Dabei treten Polypeptide einer Länge von 24000 und 28000 d auf. Somit erfolgt die HBsAg Expression ebenso wie in infizierten, humanen Hepatozyten.
- 3) A-10,7 führt in Ltk Zellen zu wesentlich höherer HBsAg Expression als HBV-DNA (Faktor 33) und als A-10,5 (Faktor 8), welches ebenfalls aus PLC/PRF/5 Zellen isoliert worden war.
- 4) Die für die erhöhte HBsAg Expression von A-10,7 verantwortliche DNA Region kartiert in der humanen DNA, zwischen 89 bp und 490 bp entfernt von der Virus-Wirt-Übergangsstelle.
- 5) Die erhöhte HBsAg Expression ist nicht auf die Anwesenheit einer Enhancersequenz in der kartierten Region zurückzuführen.
- 6) Die von A-10,7 transkribierte HBsAg mRNA enthält ca. 440 bp humaner Sequenzen und enthält die poly(A) Sequenz AATAAA, die sich von der S-Gen poly(A) Sequenz TATAAA durch einen Basenaustausch unterscheidet. Die zusätzlichen humanen Sequenzen auf der HBsAg mRNA könnten zu erhöhter mRNA Stabilität und somit erhöhter HBsAg Expression führen.

### 3. INDUKTION DES HBcAg GENS IN PLC/PRF/5 ZELLEN

Nachdem die Expression des S-Gens im Detail auf Protein- und RNA-Ebene charakterisiert worden war, sollten PLC/PRF/5 Zellen auch auf eine C-Gen Expression untersucht werden. Zwar exprimieren in vitro kultivierte PLC/PRF/5 Zellen weder HBcAg, HBeAg (Hofschneider et al., 1979; Marion et al., 1979; Skelly et al., 1979), noch HBcAg-spezifische mRNA (Edman et al., 1980), folgende Beobachtungen hatten jedoch darauf hingedeutet, daß das C-Gen dennoch strukturell intakt sein könnte:

- 1) Hybridisierungen verschiedener HBV Fragmente mit Hind III verdauter PLC/PRF/5 DNA zeigten, daß in mehreren integrierten HBV-Kopien C-Gen-spezifische Sequenzen vorliegen (Edman et al., 1980);
- 2) Integrierte C-Gen-spezifische Sequenzen in PLC/PRF/5 Zellen sind, im Gegensatz zu S-Gen Sequenzen, stark methyliert (Miller & Robinson, 1983). Eine Methylierung verhindert im allgemeinen die Expression eines Gens.

Um die Möglichkeit einer Aktivierung des C-Gens zu untersuchen, sollten PLC/PRF/5 Zellen unter bisher nicht verwendeten experimentellen Bedingungen - in vivo Zucht in NMRI nu/nu Mäusen - nochmals auf HBc/HBeAg getestet werden.

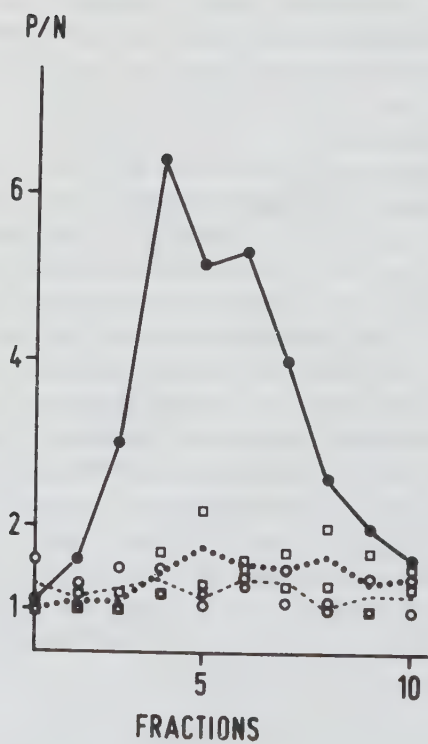
In vitro und in vivo gezüchtete PLC/PRF/5 Zellen wurden homogenisiert und mittels eines Radioimmunoassays auf Expression von HBc/HBeAg untersucht. Der verwendete RIA (Abbott HBe) kann nicht zwischen HBcAg und HBeAg diskriminieren. Während in vitro gezüchtete Zellen kein HBc/HBeAg enthielten, konnten in Tumorphomogenaten (0,4 g pro Ansatz) geringe Mengen von HBc/HBeAg nachgewiesen werden (P/N=2,1-2,5, nicht gezeigt).

Ein Zellhomogenat aus 3 g HBc/HBeAg-positiver Tumoren wurde in einem CsCl Dichtegradienten zentrifugiert, um eine Konzentration des Antigens zu erzielen. Zehn Fraktionen wurden hergestellt und auf HBc/HBeAg untersucht (Abb. 32). Die Fraktionen 3-8 waren deutlich positiv. Zellhomogenate aus in vitro gezüchteten PLC/PRF/5 Zellen und aus der Leber von unbehandelten nu/nu Mäusen wurden ebenfalls in CsCl zentrifugiert und ergaben negative Resultate.

Abb. 32

HBc/HBeAg Expression von PLC/PRF/5 Tumoren (Seite 112). Homogenate aus 6 g PLC/PRF/5 Tumoren wurden vereinigt und in CsCl zentrifugiert (siehe Methoden). Zellhomogenate zweier Lebern (jeweils 1,5 g) von Kontrollmäusen und von 3 g in vitro gezüchteter PLC/PRF/5 Zellen wurden ebenso in CsCl zentrifugiert. Die Gradienten wurden in 450 ul Fraktionen unterteilt und jeweils 200 ul durch RIA auf HBc/HBeAg Expression untersucht. Die Ergebnisse sind in P/N angegeben. Geschlossene Kreise zeigen die Ergebnisse mit Tumorphomogenaten, offene Quadrate die mit Kontrollebern, offene Kreise die mit in vitro gezüchteten PLC/PRF/5 Zellen. Die punktierte Linie gibt den Mittelwert der offenen Quadrate, die gestrichelte Linie den Mittelwert der offenen Kreise an.

Abb. 32



Um die Spezifizität der Immunreaktion zu überprüfen, wurde von G. Frösner ein Neutralisierungsversuch ausgeführt (Tab. IX): Das HBc/HBeAg in den positiven Fraktionen 4,5 und 6 des erwähnten CsCl Gradienten konnte durch Vorinkubierung mit recalcifiziertem, anti-HBe und anti-HBc-positivem Plasma MWW (Frösner et al., 1978), aber nicht mit anti-HBe, anti-HBc und anti-HBs-negativem, recalcifiziertem Plasma neutralisiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Immunreaktion spezifisch ist.

|                    | Vorinkubierung mit anti-HBe- |                 |
|--------------------|------------------------------|-----------------|
|                    | negativem                    | positivem Serum |
|                    | cpm                          | cpm             |
| Fraktion 4         | 847                          | 211             |
| Fraktion 5         | 689                          | 287             |
| Fraktion 6         | 764                          | 219             |
| Positive Kontrolle | 3758                         | 219             |
| Negative Kontrolle | 215                          | 235             |
| (Mittelwert)       |                              |                 |

Tabelle IX

Neutralisierung des HBc/HBeAg in PLC/PRF/5 Tumorphomogenaten durch anti-HBe und anti-HBc-enthaltendes Humanplasma. Aliquots der angezeigten Fraktionen des in Abb. 32 beschriebenen CsCl Gradienten, der PLC/PRF/5 Tumormaterial enthielt, wurden vor der RIA Analyse mit anti-HBe+anti-HBc--positivem bzw. Plasma, das keine HBV-Marker enthielt, inkubiert. Als Kontrollen wurden HBeAg positives und HBeAg negatives Humanserum verwendet. Die Resultate sind in cpm angegeben.

Eine HBc/HBeAg-positive Fraktion eines anderen CsCl Gradienten wurde durch den Corab RIA (Abbott) untersucht (von G. Frösner) und war ebenfalls positiv. Dieser Test ist spezifisch für HBcAg (negativ für HBeAg), ergab jedoch auch positive Ergebnisse für HBeAg (G. Frösner). So konnte nicht ermittelt werden, ob es sich hier um HBcAg oder HBeAg handelt.

Um festzustellen, ob die HBc/HBeAg Expression in nu/nu Mäusen durch Selektion einer stabilen Mutante entsteht, wurde untersucht, ob PLC/PRF/5 Tumorzellen weiterhin HBc/HBeAg exprimieren, wenn sie später in vitro gezüchtet werden: 2 g homogenisierte in vitro Zellen enthielten jedoch kein HBc/HBeAg (nicht gezeigt). Sie wurden zweimal in Weichagar kloniert und dann abermals als Tumor gezüchtet. 2 g dieser Zellen enthielten wieder HBc/HBeAg (P/N der höchsten Fraktionen 4=2,5; 5=3,5; 6=3,0). Dieser Versuch zeigt, daß die HBc/HBeAg Expression nicht durch Selektion einer stabilen Mutante erklärt werden kann; die Expression ist von den Kulturbedingungen abhängig.

Um zu überprüfen, ob die HBV Sequenzen rearrangiert waren, wurde Hind III verdaute DNA aus in vitro und in vivo kultivierten PLC/PRF/5 Zellen in einer Southernanalyse verglichen (Abb. 33). Es gibt keinen Hinweis auf DNA Rearrangements, da beide Muster von HBV-hybridisierenden Hind III Fragmenten identisch sind. Es bleibt jedoch die Möglichkeit von geringfügigen Strukturänderungen wie Punktmutationen oder Basenmodifikationen offen.

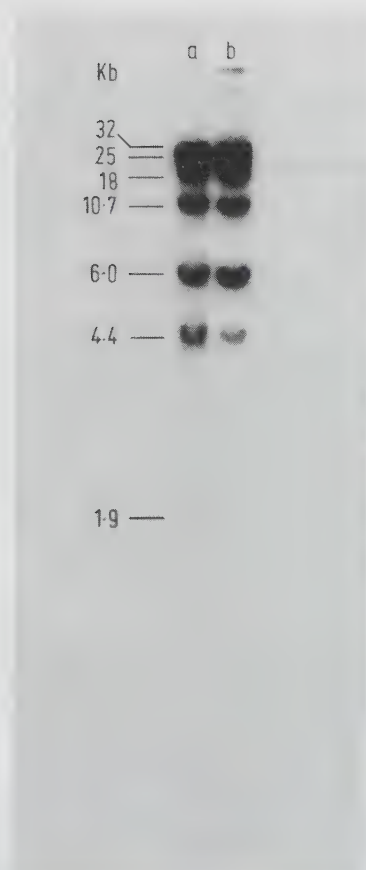


Abb. 33

Southern Analyse von in vitro und in vivo gezüchteten PLC/PRF/5 Zellen

Jeweils 10 ug DNA aus in vitro (a) und in vivo (b) gezüchteten PLC/PRF/5 Zellen wurden mit Hind III verdaut, in einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit  $^{32}\text{P}$ -HBV-DNA hybridisiert spez. Akt. =  $4 \times 10^8$  cpm/ug).

### 3.1 Diskussion der HBc/HBeAg Expression in PLC/PRF/5 Zellen

Zusammenfassend wurde nachgewiesen, daß PLC/PRF/5 Zellen - als Tumoren in nu/nu Mäusen gezüchtet - HBc/HBeAg exprimieren, während Zellen in Kultur kein HBc/HBeAg exprimieren. Dadurch ist bewiesen, daß PLC/PRF/5 Zellen intakte Gene für HBcAg enthalten.

Die Möglichkeit einer stabilen Mutante, für die in nu/nu Mäusen selektioniert wird, kann ausgeschlossen werden, da gezeigt wurde, daß Tumorzellen, die später in vitro kultiviert wurden, kein HBc/HBeAg exprimieren, aber die Synthese nach einer weiteren Kultivierung in der Nacktmaus wieder angeschaltet wird. Der funktionale Zustand ist also instabil und abhängig von der Umgebung.

Es wäre denkbar, daß eine reversible Änderung des Zustands der HBcAg Gene durch Faktoren im Serum der Nacktmaus ausgelöst wird. Eine solche Änderung könnte eine Demethylierung sein, da bekannt ist, daß HBcAg-spezifische Sequenzen in in vitro kultivierten PLC/PRF/5 Zellen methyliert sind (Miller & Robinson, 1983) und da Genmethylierung in der Regel mit einem inaktiven Zustand von Genen einhergeht. Ein weiteres Argument für Demethylierung ist die kürzlich gezeigte Induktion der HBcAg Expression in vitro gezüchteter PLC/PRF/5 Zellen durch 5' Azacytidin (Yoakum et al., 1983), welches eine Demethylierung von DNA bewirkt.

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist die HBcAg Expression in Leberzellen vermutlich für die Erkennung infizierter Zellen durch T-Zellrezeptoren und damit für die Zellyse verantwortlich. So besteht ein Selektionsvorteil für Zellen, die kein HBcAg exprimieren, wie z. B. PLC/PRF/5 Zellen. Der hier erbrachte Nachweis der induzierbaren HBc/HBeAg Expression in einer anderen Umgebung, nämlich in

nu/nu Mäusen, demonstriert, daß die Expression von HBcAg nicht durch Eliminierung oder Mutation des C-Gens abgeschaltet werden muß, sondern es ausreicht, es in einen abgeschalteten Zustand zu versetzen.

## D. DISKUSSION

Epidemiologische Daten zeigen eine hohe Korrelation zwischen der Verbreitung des Hepatitis B Virus (HBV) und des primären Leberkarzinoms (PLC) beim Menschen. Daher wird ein Kausalzusammenhang zwischen HBV Infektion und PLC Entstehung diskutiert. Ein in vitro System zur Untersuchung onkogener Eigenschaften von HBV ist gegenwärtig noch nicht verfügbar, da sich nichtmaligne Hepatozyten bisher nicht kultivieren lassen. Somit bilden durch Biopsie entnommene PLC Gewebe sowie PLC Zelllinien das einzige Ausgangsmaterial für eine molekularbiologische Analyse eines onkogenen Potentials von HBV.

DNA aus PLC Zellen kann mit Hilfe klonierter HBV DNA als Hybridisierungsprobe auf Anwesenheit von HBV Sequenzen untersucht werden. Einige PLC Gewebeproben waren bereits vor Beginn dieser Arbeit von Dr. R. Koshy in unserem Labor auf diese Weise analysiert worden, wobei ca. 50% der Proben chromosomal integrierte HBV DNA enthielten. Am Anfang dieser Dissertation stand die Frage, ob diese Häufigkeit der chromosomalen Integration von HBV DNA bei der Untersuchung weiterer PLC Gewebeproben bestätigt werden kann. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, Hinweise auf einen möglichen Wirkungsmechanismus von HBV in der Onkogenese zu erhalten.

### 1. HÄUFIGKEIT INTEGRIERTER HBV SEQUENZEN IN DER DNA VON PRIMÄREN LEBERKARZINOMZELLEN

DNA aus Biopsiematerial wurde mit dem Tüpfeltest ("dot blot") und der Southern Analyse auf Anwesenheit von HBV

Sequenzen untersucht. Die beiden Hybridisierungstests ergänzen sich in ihrer Aussage: im Tüpfeltest ist der Zustand der DNA unerheblich, da auch niedermolekulare DNA (>200 bp) effizient an Nitrozellulose bindet; der Test unterscheidet jedoch nicht zwischen episomaler und integrierter DNA. In der Southern Analyse von zellulärer DNA dagegen ist hochmolekulare DNA Voraussetzung für den Nachweis einzelner Genkopien. Durch Spaltung mit einem Restriktionsenzym, das keine oder nur eine Schnittstelle in der HBV DNA besitzt, läßt sich aber zwischen episomaler und integrierter HBV DNA unterscheiden.

In vier von neun PLC DNAs konnten integrierte HBV Sequenzen nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Koshy et al. (1981) und Brechot et al. (1981), die während der Durchführung der hier vorgestellten Arbeiten veröffentlicht wurden. Einer der Tumoren (F1) enthielt HBV DNA von 3,2 kb und geringerer Länge, welche nach Summers et al (1978) und Brechot et al. (1981) als episomale replizierende HBV DNA anzusprechen ist. Im Unterschied zu Ausführungen in der Einleitung (Seite 15) könnte dies bedeuten, daß im Tumor- oder zumindest im peritumoralen Gewebe HBV Replikation stattfindet.

In vier von neun Leberkarzinom-DNA-Proben konnte jedoch keine HBV DNA nachgewiesen werden. Für die nur im Southerntest untersuchten PLC DNAs kommen als Erklärung für die fehlende Hybridisierung technische Gründe in Betracht. Zwei PLC DNA Proben (D19, T6) zeigten jedoch im Tüpfeltest keine Hybridisierung. Da dieser sehr sensitiv und technisch unproblematisch ist, muß gefolgert werden, daß diese DNAs tatsächlich keine HBV DNA enthalten. Dies ist, da Brechot et al. und Koshy et al. keine Tüpfeltests, sondern lediglich Southernhybridisierungen durchgeführt hatten, der erste eindeutige Nachweis, daß manche PLC Gewebe keine HBV Sequenzen enthalten.

Insgesamt stimmen die Ergebnisse mit der Hypothese einer kausalen Beteiligung von HBV bei der Entstehung primärer Leberkarzinome überein, wobei jedoch auch andere Faktoren (z. B. Aflatoxin, Alkohol) als Ursache in Betracht zu ziehen sind.

## 2. INTEGRATIONSMUSTER VON HBV DNA IN ZELLEN AUS BIOPSIEMATERIAL UND DER PLC/PRF/5 ZELLINIE

HBV-spezifische DNA Fragmente in Zellen aus Biopsiematerial und der PLC/PRF/5 Zelllinie wurden nach Verdau mit den Restriktionsenzymen Hind III und Eco RI nachgewiesen. Hind III wurde gewählt, da es keine Schnittstelle in den drei damals veröffentlichten HBV Sequenzen (siehe Seite 43) besitzt. Daher war anzunehmen, daß es nur in humaner DNA spalten und somit die Zahl HBV-spezifischer Fragmente mit der Anzahl integrierter HBV Kopien übereinstimmen würde. Überraschenderweise ergab jedoch die spätere Sequenzierung klonierter HBV-spezifischer Fragmente, daß doch im HBV Genom Hind III Schnittstellen vorhanden sein können. Daher ist die Kopienzahl integrierter HBV Genome in den Southernanalysen nur grob schätzbar: es sind in den verschiedenen Proben zwischen einer und acht integrierter Kopien nachweisbar.

Bei einem Vergleich der Integrationsmuster sollte überprüft werden, ob in PLC DNAs verschiedenen Ursprungs Restriktionsfragmente gleicher Größe entstehen. Dies gäbe einen ersten Hinweis auf gleiche Integrationsstellen in unterschiedlichen DNAs, müßte aber anschließend durch Kartierung mit weiteren Restriktionsenzymen bestätigt werden. Da in den verschiedenen PLC DNAs jedoch keine HBV-spezifischen Hind III Fragmente gleicher Größe entstehen, gibt es keine Hinweise auf gleiche Integrationsstellen im Genom von Zellen aus verschiedenen Tumoren. Die

Vermutung einer gemeinsamen Integrationsstelle nach Identifizierung von 12,3 und 6,5 kb großen HBV-spezifischen Hind III Fragmenten aus verschiedenen PLC-DNAs (Koshy et al., 1981) konnte hier nicht bestätigt werden. Ein Vergleich der in dieser Arbeit beobachteten Fragmentgrößen mit den Ergebnissen von Brechot et al. (1981) ist nicht möglich, da diese die Größen der HBV-spezifischen Hind III Fragmente nicht angeben.

Beim jetzigen Wissenstand muß man also davon ausgehen, daß HBV Sequenzen in verschiedenen PLC DNAs an unterschiedlichen Stellen im Wirtsgenom integriert sind, was auf Seite 132 im Zusammenhang mit möglichen Mechanismen der Onkogenese noch ausführlicher diskutiert wird. Daraus folgt, daß HBV DNA vermutlich durch nicht-homologe Rekombination integriert. Hierunter versteht man, daß nur relativ kurze homologe Sequenzen von ca. 10 Basenpaaren, keineswegs aber lange homologe Sequenzen der Rekombination zugrunde liegen. So konnten Gahlmann et al. (1982) für die Integration von Adenovirus-DNA Sequenzhomologien von 8-12 bp zwischen Virus- und Wirts-DNA nachweisen. Auch in den aus PLC/PRF/5 DNA klonierten HBV-spezifischen Sequenzen konnten ähnlich lange Homologien mit der jeweils flankierenden Human DNA von S. Koch gezeigt werden.

In einigen PLC DNAs (U1, T2, W1 und PLC/PRF/5) entstehen bei Spaltung mit Eco RI Enzym, für welches es in der HBV DNA eine Schnittstelle gibt, Banden von 3,2 bis 3,3 kb, was der Größe des HBV Genoms entspricht. Deshalb ist die Annahme, daß "head to tail" Konkatemere von HBV DNA integriert sind, naheliegend (siehe auch Seite 131). Eine solche Organisation integrierter viraler DNA wurde schon mehrfach beobachtet: u. a. bei integrierter HBV-DNA in Hepatomzellen (Brechot et al., 1981; Dejean et al., 1983) und bei integrierter SV40 DNA (Clayton & Rigby, 1981). Die hier vorgestellten Daten lassen jedoch keine Rückschlüsse über den Ursprung solcher

"head to tail" Konkatemere zu. Unter Annahme eines "rolling circle" Mechanismus könnten diese bei der Replikation der HBV DNA entstehen. Eine andere Möglichkeit wäre eine homologe Rekombination zweier oder mehrerer HBV Moleküle im episomalen oder integrierten Zustand. Hinweise für eine homologe Rekombination in eukaryontischen Zellen wurden von Folger et al. (1983) erbracht, die nach Mikroinjektion von Thymidinkinase Genen in kultivierte Zellen integrierte "head to tail" Konkatemere nachweisen konnten.

Die Anwesenheit integrierter HBV-DNA in nichtmalignem Lebergewebe (T1 Peritumor) zeigt, daß eine Integration auch ohne maligne Transformation stattfinden kann. Dies bestätigt die Ergebnisse von Brechot et al. und Koshy et al. Im T1 Peritumor ist HBV-DNA an einer anderen Stelle integriert als im T1 Tumor. Möglicherweise führte daher nur die T1 Tumor-Integration zu maligner Transformation.

### 3. STRUKTUR UND FUNKTION KLONIRTER INTEGRIERTER HBV-DNA

Durch Southernanalysen wurde gezeigt, daß ca. 50% der untersuchten PLC Proben integrierte HBV DNA enthalten. Diese Sequenzen sind an unterschiedlichen Stellen im Wirtsgenom integriert. Wenn man davon ausgeht, daß der Onkogenese eine kooperative Wechselwirkung zwischen Virus- und Wirtssequenzen zugrunde liegt, erhebt sich zunächst die Frage nach der Intaktheit der integrierten viralen DNA. Weiterhin muß untersucht werden, welche kooperativen Möglichkeiten bestehen.

Eine Feinanalyse der Struktur und Funktion integrierter HBV DNA läßt sich nur an klonierten DNA Fragmenten durchführen. Als Ausgangsmaterial für die Klonierung wurde DNA aus der PLC/PRF/5 Zelllinie gewählt, die ca. 6-8 Kopien integrierter HBV enthält (Brechot et al., 1980; Chakraborty

et al., 1980; Edman et al., 1980). Das Ziel einer solchen Analyse ist die Charakterisierung aller in PLC/PRF/5 DNA integrierten HBV Kopien. Zwei von ihnen (A-6,0 und A-10,7) werden hier beschrieben, zwei weitere (A-10,5 und A-4,0) sind bereits kloniert (durch S. Koch) und die restlichen werden gegenwärtig in diesem Labor isoliert und charakterisiert.

### 3.1 Intaktheit der HBV Sequenzen

Die Fragmente A-6,0 und A-10,7 wurden je zweimal isoliert. Dies wurde zum Anlaß genommen, eine etwaige Veränderung der Organisation dieser Fragmente durch den Klonierungsprozeß zu überprüfen. Da jeweils die Fragmente gleicher Größe eine identische Restriktionskarte aufweisen, können sie als identisch angesprochen werden; demnach ist eine Veränderung während der Klonierung auszuschließen.

A-6,0 enthält beide Enden der integrierten HBV Sequenzen, da auf beiden Seiten humane DNA liegt. Im Gegensatz dazu ist in A-10,7 wegen einer unerwarteten Hind III Schnittstelle in der HBV-DNA nur ein Teil der integrierten viralen DNA und flankierende Human DNA nur auf einer Seite vorhanden.

Das Ergebnis der Restriktionskartierung beider Fragmente läßt den Schluß zu, daß die HBV Sequenzen - mit Ausnahme einer Deletion von ca. 450 bp in A-6,0 - kolinear mit viraler DNA sind. Dies wurde durch partielle Sequenzanalyse (durch R. Koshy und S. Koch) beider Klone und durch den Nachweis der HBsAg Expression von A-10,7 bestätigt. Kleinere "frameshift"- oder Punktmutationen in den nichtsequenzierten DNA Regionen sind allerdings nicht auszuschließen und könnten nur durch vollständige Sequenzierung der Fragmente aufgeklärt werden.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Resultaten in anderen Systemen, die ergeben haben, daß integrierte virale DNA in der Regel durch umfangreiche DNA Rearrangements gekennzeichnet ist, so z. B. bei Adenovirus 2 DNA (Sambrook et al., 1979) und SV40 DNA (Clayton & Rigby, 1981). Auch woodchuck hepatitis virus-spezifische Fragmente, die aus der DNA von Woodchuck Leberkarzinomen kloniert wurden, enthalten äußerst komplizierte DNA Rearrangements (Ogston et al., 1982). Keines der viralen Gene außer dem kürzesten, dem X-Gen, ist intakt. Ein von Dejean et al. (1983) aus PLC/PRF/5 DNA isoliertes HBV-spezifisches Fragment, das mit den hier vorgestellten nicht identisch ist, setzt sich aus drei subgenomischen HBV Fragmenten zusammen, von denen die zwei größten in ihrer relativen Orientierung zueinander invertiert sind. Ein zweites kloniertes HBV-spezifisches Fragment, das aus PLC DNA isoliert wurde, enthält dagegen ein vollständiges HBV Genom und, daran anschließend, weitere 25% eines HBV Genoms (Dejean et al., 1983).

### 3.2 Lage der Integrationsstellen

In A-6,0 konnte die Integrationsstelle im viralen Genom durch Hybridisierung mit zwei Fragmenten aus HBV-DNA (Proben II und III) in unmittelbarer Nähe einer Bam HI Schnittstelle (Position 1436 in der ayw HBV-DNA) kartiert werden (siehe Abb. 11). Somit liegt die Integrationsstelle eindeutig in der "Gap" Region der HBV-DNA. Durch Sequenzierung der Virus-Wirt Übergangsstelle (von R. Koshy) wurde sie an Position 1408/1409 bzw. 1417/1418 lokalisiert. Die in A-10,7 enthaltene Integrationsstelle liegt in der gleichen Region, aber nicht exakt an derselben Position: ein HBV Bam HI--Hind II Fragment (1436-1675, Probe III) hybridisiert mit A-10,7 DNA, aber nicht mit dem linken Ende der HBV Sequenzen von A-6,0 DNA (Acc I A Fragment); demnach befindet sich die virale Integrationsstelle in A-10,7 weiter in Richtung

5' Ende des HBV S-Stranges als die Integrationsstelle in A-6,0. Durch Nukleotidsequenzierung konnte die virale Integrationsstelle in A-10,7 von S. Koch an Position 1614/1615 in der HBV DNA, also ebenfalls in der "Gap" Region, lokalisiert werden. Da aber im Fall von A-10,7 aufgrund der zur Klonierung verwendeten Hind III Stelle nur ein Teil der integrierten HBV Sequenzen isoliert wurden, ist unbekannt, an welcher Position sich die Integrationsstelle in der fehlenden viralen DNA befindet. Sie muß aber, wenn man von der Möglichkeit von DNA Rearrangements der integrierten viralen Sequenzen, bzw. einer "head to tail" Organisation absieht, zwischen Position 2762 (Hind III Schnittstelle) und 1614/1615 liegen. Auch in zwei weiteren HBV-spezifischen Fragmenten (A-10,5 und A-4,0) die ebenfalls aus PLC/PRF/5 DNA isoliert wurden, konnte S. Koch durch Sequenzanalyse der Virus-Wirt-Übergangsstelle zeigen, daß die Integrationsstellen der HBV-DNA in der "Gap" Region liegen. In diesen beiden Fragmenten fehlt, wie auch in A-10,7, aufgrund der Hind III Schnittstelle ein Teil der integrierten viralen DNA. Somit ist auch hier unbekannt, an welcher Position sich die Integrationsstelle in den fehlenden Virussequenzen befindet.

In allen vier Fragmenten liegt also wenigstens eine Integrationsstelle in der "Gap" Region der HBV DNA. Dies widerlegt die Hypothese von Gray et al. (siehe Seite 11), wonach eine Denaturierung der Stränge zwischen "Nick" und "Gap" terminal redundante Sequenzen schafft, welche - ähnlich wie bei Retroviren - zu einem spezifischen Integrationsmechanismus führen. Stattdessen kann HBV-DNA vermutlich an jeder beliebigen Stelle integrieren, jedoch vorzugsweise in der einzelsträngigen "Gap" Region (Position 140-1690). Da über 99% der HBV-DNA Moleküle diese einzelsträngige Region enthalten (Delius et al., 1983), ist aufgrund der hier vorgelegten Ergebnisse zu erwarten, daß ein Großteil der integrierten HBV DNA Moleküle in dieser

Region integriert hat.

In scheinbarem Widerspruch zu diesen Daten befinden sich die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Dejean et al. (1982) lokalisierten die viralen Integrationsstellen in den zwei erwähnten (Seite 124) integrierten HBV Fragmenten zwischen Position 1750 und 2600, Ogston et al. (1982) kartierten die Integrationsstellen in zwei integrierten WHV Inserts zwischen Position 2100 und 2300 des viralen Genoms, also alle außerhalb der "Gap" Region. In beiden Untersuchungen erfolgte die Lokalisierung der Integrationsstellen jedoch nicht durch Sequenzanalysen, sondern lediglich durch Restriktions- und Heteroduplexkartierungen, die im Gegensatz zur Sequenzierung zu Fehlinterpretationen führen können. Die in dieser Dissertation mit Restriktionskartierung und Hybridisierungen lokalisierten Integrationsstellen wurden dagegen durch die Sequenzierungsergebnisse von S. Koch und R. Koshy bestätigt. Daher läßt sich insgesamt gesehen doch die These aufrechterhalten, daß die Wahrscheinlichkeit für eine Integration in der "Gap" Region am größten ist.

Die Integrationsstelle in der humanen DNA ist in beiden Klonen verschieden. Die Restriktionsmuster zeigen keinerlei Gemeinsamkeiten und die Inserts hybridisieren mit verschiedenen Fragmenten in Hind III verdauter, nichtinfizierter humaner DNA. Dies war auch auf Grund der vorangegangenen Southernanalysen von DNA aus verschiedenen Hepatomen erwartet worden. Auch die Sequenzanalysen der Virus-Wirt-Übergangsstellen zeigen, daß die Integrationsstellen in beiden Inserts verschieden sind.

### 3.3 Expression viraler Gene

Durch Einschleusung von pAl 6,0 und pAl 10,7 zusammen mit dem Thymidinkinase Gen (aus Herpes Simplex Virus) in Maus

Ltk<sup>-</sup> Zellen wurde überprüft, ob das S-Gen in A-10,7 und das S- und C-Gen in A-6,0 intakt sind, was die Restriktionskarten nahelegten. Durch Radioimmunassay konnte gezeigt werden, daß Ltk<sup>+</sup> Zellen, die A-10,7 DNA integriert enthalten, HBsAg exprimieren, während A-6,0 weder zu meßbarer HBsAg- noch HBc/HBeAg Expression führt.

Da die Sequenz von A-6,0 nicht vollständig aufgeklärt ist, gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten für die fehlende Expression von HBsAg und HBcAg. Für das S-Gen ist aufgrund der Restriktionskarte anzunehmen, daß der SV 40 "late" ähnliche Promotor und das gesamte Strukturgen, nicht aber die Polyadenylierungs- und Terminationssequenzen in A-6,0 enthalten sind. Daher könnten einerseits Punktmutationen im Promotor oder im Gen selbst, andererseits ein Fehlen geeigneter Polyadenylierungs- oder Terminationssignale in der flankierenden Human DNA für die ausbleibende HBsAg Expression verantwortlich sein. Das C-Gen ist nach Restriktions- und Sequenzierungsdaten fast komplett vorhanden; allerdings ist sein Stopkodon deletiert, wodurch die Leserahmen des C- und P-Gens verknüpft sind. Ein entstehendes Protein wäre demnach sowohl aus C-Gen- wie P-Gen-spezifischen Sequenzen zusammengesetzt und würde daher möglicherweise nicht oder nur sehr mangelhaft mit HBcAg-spezifischen Antikörpern reagieren.

Das HBsAg Expressionsprodukt von A-10,7 wurde durch Radioimmunassay, CsCl Dichtegradientenzentrifugierung, Elektronenmikroskopie und SDS Polyacrylamidgel-Elektrophorese charakterisiert und ist nach all diesen Kriterien nicht von HBsAg, das in humanen Hepatozyten exprimiert wird, zu unterscheiden.

Bei vergleichenden Expressionsmessungen ergab sich überraschenderweise, daß die HBsAg Expression von pA1-10,7 um wenigstens eine Größenordnung höher liegt als die von

pKK HBs 34 DNA, welche das HBV S-Gen einschließlich der viralen Regulationssequenzen, aber keine humane DNA enthält. Die für die erhöhte Expression des S-Gens in A-10,7 verantwortliche DNA Region konnte in der humanen DNA, und zwar zwischen 89 bp und 490 bp entfernt von der Virus-Wirt-Übergangsstelle kartiert werden. Expressionsvergleiche mit anderen DNA Fragmenten ergaben nämlich folgendes: 1) Lambda Al 10,7 und Lambda Al 10,5 DNA wurden in Ltk<sup>-</sup> Zellen eingeschleust und die HBsAg Expression isolierter Zellkolonien miteinander verglichen. Das 10,5 kb Fragment, das von S. Koch ebenfalls aus PLC/PRF/5 DNA isoliert worden war, enthält dieselben HBV Sequenzen wie A-10,7; außerdem sind mindestens die ersten 89 bp der flankierenden Human DNA identisch (Sequenzierung durch S. Koch). Erst weiter entfernt liegende humane Sequenzen sind aufgrund der Restriktionskarte verschieden. Da die HBsAg Expression von Lambda Al 10,7 in Ltk Zellen um eine Größenordnung höher liegt als die von Lambda Al 10,5, müssen humane DNA Sequenzen in A-10,7, die weiter als 89 bp entfernt von der Virus-Wirt-Übergangsstelle liegen, für die hohe HBsAg Expression verantwortlich sein. Auch hier gilt die Einschränkung, daß Punktmutationen als Erklärung des Expressionsanstiegs nicht auszuschließen sind, solange die Sequenzen der viralen DNA Anteile in A-10,7 und A-10,5 nicht vollständig aufgeklärt sind.

2) Versuche mit dem Pst I A Fragment und einem 2,5 kb langen Eco RI-Hind III Subfragment von A-10,7 (siehe Abb. 26) zeigen, daß die kritische Region innerhalb der an die Virus-Wirt-Übergangsstelle angrenzenden 490 bp humaner DNA endet. Aus der Kombination beider Resultate ergibt sich, daß die für die erhöhte HBsAg Expression verantwortliche DNA Region zwischen 89 bp und 490 bp entfernt von der viralen DNA liegt.

Die erhöhte HBsAg Expression von A-10,7 könnte durch die Anwesenheit einer Enhancersequenz in der humanen DNA erklärt

werden. Solche Enhancersequenzen können am 5' oder 3' Ende eines Gens bis zu 10 kb entfernt wirken (Khoury & Gruss, 1983; Übersichtsartikel). Durch Ligierung eines Subfragments aus A-10,7 mit dem Thymidinkinase Gen wurde überprüft, ob sich eine solche Enhancersequenz auf dem klonierten DNA Fragment befindet, wodurch eine deutlich erhöhte Zahl tk-positiver Kolonien zu erwarten gewesen wäre (Hearing et al., 1983; Jolly et al., 1983). Da dies jedoch nicht der Fall war, ist die Anwesenheit einer Enhancersequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschliessen.

Eine andere Erklärung für die erhöhte HBsAg Expression würde sich anbieten, wenn die humanen Sequenzen zusammen mit den viralen in mRNA transkribiert würden. Da einerseits die virale DNA Region, welche die HBsAg Poly(A) Sequenz enthält und welche für die HBsAg Expression notwendig ist (Pourcel et al., 1982a), nicht in A-10,7 enthalten ist, andererseits aber dennoch HBsAg in großen Mengen exprimiert wird, war die Transkription zellulärer Sequenzen und die Verwendung eines humanen Polyadenylierungssignals sehr wahrscheinlich.

Aus der Länge der aus Ltk 2425 Zellen isolierten A-10,7 HBsAg mRNA (2,2 kb) und der Position ihres 5' Endes, das, wie schon von Cattaneo et al., (1983b) beschrieben, im preS Gen liegt, ergibt sich nach Subtraktion einer angenommenen Länge von 140 poly(A) Nukleotiden (Littauer & Soreq, 1982) die Position des 3' Endes der HBsAg mRNA: ca. 440 Nukleotide entfernt von der Virus-Wirt Übergangsstelle in humaner DNA. Genau an dieser Position wurde von S. Koch durch Sequenzanalyse ein poly(A) Signal identifiziert. Die A-10,7 HBsAg mRNA enthält also ca. 440 Nukleotide humanen Ursprungs und verwendet ein poly(A) Signal (AATAAA), das sich in einer Base von der HBV HBsAg poly(A) Sequenz (TATAAA) unterscheidet.

Eine plausible Erklärung für die erhöhte HBsAg Expression

von A-10,7 wäre durch eine größere Stabilität dieser mRNA gegenüber der HBV HBsAg mRNA gegeben. Die molekulare Grundlage einer solchen erhöhten mRNA Stabilität könnte in einer Zunahme intramolekularer Basenpaarung liegen. Dies ließe sich, sobald die Sequenz der betreffenden DNA Region aufgeklärt ist, mit Hilfe von Computeranalysen überprüfen. Ähnliche Beispiele eines drastischen Einflusses von 3' terminalen Sequenzen auf die Stabilität eukaryontischer mRNAs sind in der Literatur nicht beschrieben. Es gibt jedoch einen vergleichbaren Fall bei einer prokaryontischen mRNA (Holmes et al., 1983): bei der Regulation der Expression des Integrase Gens (int) des Lambdaphagen können zwei mRNAs transkribiert werden, deren 3' terminale Sequenzen sich unterscheiden. Nur eine dieser mRNAs ist stabil und führt daher zu einer weit höheren Expression der Integrase als die andere mRNA.

A-10,5 und HBV DNA wurden nicht direkt miteinander verglichen, aber vergleichende Expressionsuntersuchungen mit A-10,7 als gemeinsamem Nenner legen nahe, daß auch A-10,5 eine höhere HBsAg Expression verursacht als HBV DNA; allerdings ist der Unterschied geringer als im Fall von A-10,7. Da in A-10,5 ebenfalls die viralen poly(A) und Terminationssignale des HBsAg-Gens fehlen, ist ein ähnlicher Mechanismus anzuführen wie bei A-10,7. Das Gleiche trifft auch auf A-4,0 zu, das ebenfalls in Ltk Zellen zu HBsAg Expression führt.

#### 4. BEDEUTUNG DER HBV DNA INTEGRATION FÜR DIE ENTSTEHUNG VON LEBERKARZINOMEN

Hybridisierungsanalysen von DNA aus primären Leberkarzinomzellen haben ergeben, daß HBV Sequenzen in mindestens 50% der untersuchten PLC DNAs chromosomal integriert sind (Brecht et al., 1981; Koshy et al., 1981). Wie hier gezeigt

wurde, läßt sich dieses Ergebnis auch bei einer Verbreiterung des Materials bestätigen. Dieser Tatbestand steht mit der aufgrund epidemiologischer Daten postulierten Beteiligung von HBV bei der Genese des primären Leberkarzinoms in Übereinstimmung.

In dieser Dissertation wurde als Hybridisierungstest erstmalig neben der Southern Analyse auch der sensitivere und technisch einfachere Tüpfeltest verwendet. Da in diesem einige PLC DNAs nicht mit HBV DNA hybridisieren, ist zum ersten Mal bewiesen, daß manche PLC DNAs keine HBV Sequenzen enthalten. Somit müssen außer HBV auch andere Agenzien (z. B. Aflatoxin, Alkohol) als Ursache der PLC Genese in Betracht gezogen werden. Selbst für die HBV-negativen Fälle ist allerdings eine Kausalfunktion von HBV denkbar, wenn man einen "hit and run" Mechanismus (siehe Seite 27) annimmt, nach dem erst durch eine Deletion integrierter HBV Sequenzen eine für die Onkogenese kritische Veränderung der Wirts-DNA entsteht.

Unterstellt man, daß HBV in die Onkogenese eingreift, konnte durch die hier vorgestellte Charakterisierung integrierter HBV Sequenzen wichtige Ergebnisse bezüglich des in Frage kommenden Mechanismus zusammengetragen werden.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann ausgeschlossen werden, daß, wie bei SV40, Polyoma Virus und Adenovirus, die Expression eines viralen Genprodukts die Ursache der malignen Transformation ist. Dagegen sprechen die lange Latenzzeit der PLC Entstehung sowie die seltene Expression viraler Genprodukte in PLC Zellen (siehe Seite 27, 28). Letztere steht jedoch in scheinbarem Widerspruch zu der hier und von Brechot et al. (1981) beobachteten "head to tail" Organisation vieler integrierter HBV Sequenzen, da in diesem Zustand alle Leserahmen erhalten sind. Man muß somit annehmen, daß integrierte HBV Gene häufig intakt aber stumm

sind. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für das HBcAg-Gen in PLC/PRF/5 Zellen bewiesen werden, das normalerweise nicht exprimiert wird, jedoch unter veränderten Kulturbedingungen wie Zucht in nu/nu Mäusen (diese Dissertation) oder in Gegenwart von 5' Azacytidin (Yoakum et al., 1983) induziert werden kann. Als Erklärung der fehlenden Expression strukturell intakter Gene kommt in erster Linie eine Methylierung in Frage (Miller & Robinson, 1983; Yoakum et al., 1983).

Wenn man die Expression eines viralen Genprodukts als Ursache der PLC Entstehung ausschließt, kommt nur ein Mechanismus in Betracht, welcher eine Wechselwirkung zwischen integrierten HBV Sequenzen und humanen Genen vorsieht. Da man aufgrund der Integrationsmuster DNAs davon ausgehen kann, daß HBV Sequenzen in verschiedenen PLC DNAs an unterschiedlichen Stellen integriert sind, ist es in diesem Fall sehr unwahrscheinlich, daß nur ein für die Onkogenese kritisches Humangen existiert. Daraus folgt, daß, falls HBV in die Onkogenese eingreift, dies durch Beeinflussung der Expression verschiedener Humangene geschehen kann. Daher liegt dieser Sachverhalt anders als bei Mammarkarzinomen, die durch "mouse mammary tumour virus" (MMTV), das kein eigenes Onkogen trägt, verursacht werden. MMTV Sequenzen finden sich in fast allen untersuchten Tumoren in der gleichen Region der Wirts-DNA integriert, nämlich in unmittelbarer Nähe des vermutlichen zellulären Onkogens int-1 (Nusse & Varmus, 1982).

Die Integrationsstellen in den vier HBV-spezifischen Fragmenten liegen zwar nicht exakt an der gleichen Stelle, jedoch in der gleichen Region der viralen DNA (siehe Seite 125). Daher besteht die Möglichkeit, daß sich in dieser eine für eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Virus- und Wirtssequenzen verantwortliche Sequenz (Promotor, Enhancer) befindet.

In dieser Arbeit standen zwei aus PLC/PRF/5 Zellen isolierte HBV-spezifische Fragmente (A-6,0 und A-10,7) für eine Feinanalyse zur Verfügung. Man muß einräumen, daß die für die Onkogenese kritische Integration möglicherweise nicht in diesen enthalten ist, sondern in einer der restlichen, bisher nicht genau analysierten HBV-Kopien in PLC/PRF/5 DNA. Auf alle Fälle aber sind die Ergebnisse brauchbar zur Entwicklung von Modellvorstellungen und bahnten methodisch den Weg für die anstehende Klonierung und Charakterisierung der restlichen Fragmente, die zur Zeit durchgeführt wird.

Zunächst wurde versucht, Sequenzen von Onkogenen in der flankierenden Human DNA von A-6,0 und 10,7 nachzuweisen. Bisher wurden von den ca. 20 bekannten Onkogenen neun auf Homologie durchgesehen (Abb. 17), die aber in der Hybridisierung alle negativ waren. Versuche mit den fehlenden Onkogenen stehen noch aus.

Weiterhin wurde untersucht, ob die klonierten Fragmente im NIH 3T3 Transformationstest ansprechen, was aber nicht der Fall ist. Hierzu ist anzumerken, daß in diesem Test nur ein positives Ergebnis signifikant ist; die nichterfolgende Transformation durch A-6,0 und A-10,7 schließt nicht aus, daß integrierte HBV Sequenzen eine Rolle in der malignen Transformation von PLC/PRF/5 Zellen gespielt haben, insbesondere da

1) nur Teile der flankierenden DNA kloniert wurden. Unter Umständen wurden dadurch die für die neoplastische Transformation verantwortlichen Sequenzen durch die Klonierung nicht erfasst.

2) maligne Transformation möglicherweise zellspezifisch ist. Die Tatsache, daß A-6,0 und A-10,7 Fragmente NIH 3T3 Zellen nicht transformieren können, schließt nicht aus, daß sie für die neoplastische Transformation von Hepatozyten verantwortlich sein können, da nicht alle Onkogene NIH 3T3

Zellen transformieren.

3) nur bei einem Mechanismus (siehe b, Einleitung), in dem ein dominant wirkendes Onkogen für die maligne Transformation verantwortlich ist, eine morphologische Transformation von NIH 3T3 Zellen zu erwarten ist. Falls der Transformation jedoch ein anderer Mechanismus (Inaktivierung eines Suppressorgens) zugrunde liegt, sollte eine Transfektion klonierter Fragmente nicht zur Transformation von NIH 3T3 Zellen führen.

Man muß also offenlassen, ob tatsächlich keine onkogenen Eigenschaften auf den flankierenden Humansequenzen vorhanden sind, oder ob sich nicht doch nach experimenteller Bewältigung der noch ungelösten Probleme (Klonierung der restlichen Fragmente, Hybridisierung mit weiteren Onkogenen, Transfektion von Hepatozyten) eine veränderte Sachlage ergibt. Auch wenn man dies offenhält, ergeben sich aus der in dieser Dissertation vorgestellten Feinanalyse zweier HBV-spezifischer Fragmente die folgenden Hinweise auf mögliche Wirkungsmechanismen von HBV in der PLC Entstehung:

1) Durch die Integration der HBV-DNA können erhebliche Deletionen in der Human DNA entstehen, wie im Fall von A-6,0 gezeigt wurde. Ein ähnlicher Sachverhalt besteht bei Retinoblastomen, wo häufig Deletionen an der gleichen Stelle der zellulären DNA vorliegen (Benedict et al., 1982). Wenn die Deletion als Folge der HBV DNA Integration kein Einzelfall ist, läßt sich formalgenetisch an folgenden Wirkungsmechanismus denken: Durch die Deletion wird ein Wirts-Gen inaktiviert (vergl. Mechanismus c; Seite 27), das in funktionalem Zustand die neoplastische Transformation unterdrückt. Man müßte ferner annehmen, daß das zweite Allel des betreffenden Gens entweder auch inaktiviert vorliegt oder dessen Expression aufgrund eines Gendosiseffekts nicht ausreicht, um die neoplastische Transformation der Zellen zu unterdrücken. Falls ein solcher Mechanismus tatsächlich

zutraf, sollte A-6,0 NIH 3T3 Zellen nicht transformieren, denn NIH 3T3 Suppressorgene wären auch nach Einschleusung von A-6,0 vorhanden, es sei denn, diese würden durch homologe Rekombination mit A-6,0 inaktiviert. Da aber die homologe Rekombination mit chromosomaler DNA äußerst selten auftritt (Steele et al., 1984), kann diese Möglichkeit mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Ein experimenteller Beweis eines onkogenen Potentials von A-6,0 wäre daher schwierig zu führen. Hinweise könnten vielleicht durch Zellfusionsexperimente erhalten werden (vergl. Harris et al., 1979), wenn gezeigt werden könnte, daß Zellen, die das normale zelluläre Allel von A-6,0 enthalten, nicht transformiert sind, jedoch nach Verlust dieses Gens transformieren.

2) Es kann zu einer funktionellen Wechselwirkung zwischen integrierten viralen und flankierenden humanen Sequenzen kommen (siehe A-10,7 HBsAg mRNA), wodurch die Expression von HBsAg um mindestens eine Größenordnung gesteigert wird. Auch bei der HBsAg mRNA Transkription von A-10,5 und A-4,0 (beide von S. Koch ebenfalls aus PLC/PRF/5 Zellen isoliert) muß man annehmen, daß humane Sequenzen kotranskribiert werden, da diese beiden Inserts ebenfalls zu HBsAg Expression führen, obgleich die viralen poly(A)- und Terminationssignale nicht vorhanden sind. Die Anwesenheit humaner Sequenzen auf diesen Transkripten könnte Anlaß zu deren Translation geben, denn in A-10,7, A-10,5 und A-6,0 finden sich in der flankierenden DNA Leserahmen. Diese müssen durch weiterführende Sequenzierungsarbeiten noch vollständig aufgeklärt werden. Diese Leserahmen könnten zur Expression chimärer, aus Virus- und Wirtssequenzen zusammengesetzter Proteine, oder zu Proteinen ausschließlich humanen Ursprungs führen. Noch ist allerdings in keinem Fall gezeigt, daß solche Proteine tatsächlich exprimiert werden. Hierfür sind vor allem in vitro Translationsversuche mit den betreffenden mRNAs notwendig.

Die Schlüsselfrage, ob solche exprimierten mRNAs und/oder Proteine eine Funktion in der malignen Transformation haben, ließe sich durch Einschleusung der Inserts in nichtmaligne Hepatozyten untersuchen, sobald solche zur Verfügung stehen. Eine experimentelle Möglichkeit, nichtmaligne Hepatozytenzelllinien zu etablieren, bestünde durch Transfektion primärer Hepatozytenkulturen mit Genen, die Zellen immortalisieren (z. B. Adenovirus Ela Gen; Ruley, 1983), aber nicht transformieren. Dies wird zur Zeit versucht. Solche immortalisierten Hepatozytenzelllinien könnten als spezifische Versuchssysteme zum Nachweis eines onkogenen Potentials von HBV-spezifischen Fragmenten verwendet werden.

## E. MATERIAL UND METHODEN

### 1. MATERIAL

#### 1.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme

##### Antibiotika

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Ampicillin               | Sigma |
| Chloramphenicol          | Sigma |
| Kanamycin-Sulfat         | Serva |
| Tetracyclin-Hydrochlorid | Sigma |

##### Sonstige Chemikalien

|                                     |                 |
|-------------------------------------|-----------------|
| Acrylamid                           | Serva           |
| Agarose                             | Seakem          |
| Aminopterin                         | Serva           |
| Ammoniumpersulfat                   | Merck           |
| Bacto Agar                          | Difco           |
| Bacto Trypton                       | Difco           |
| Caesium chlorid                     | Baker Chemicals |
| Cetylmethylammoniumbromid           | Eastman, Kodak  |
| Dimethylformamid                    | Merck           |
| Dithiothreitol                      | Merck           |
| Deoxyribonukleosidtri-<br>phosphate | Boehringer      |
| Ethidiumbromid                      | Sigma           |
| Ficoll                              | Pharmacia       |
| Glyoxal                             | Ega Chemie      |

|                                                      |        |
|------------------------------------------------------|--------|
| Guanidin Hydrochlorid                                | Serva  |
| Guanidin Isothiocyanat                               | Fluka  |
| Hefeextrakt                                          | Difco  |
| Hypoxanthin                                          | Serva  |
| Isopropylthiogalaktosid                              | Serva  |
| 2-Merkaptoäthanol                                    | Merck  |
| N,N'-Methylenbisacrylamid                            | Serva  |
| Polyäthylenglycol 6000                               | Serva  |
| Putrescin                                            | Serva  |
| Polyvinylpyrrolidon                                  | Serva  |
| Spermidin                                            | Serva  |
| Rinderserumalbumin                                   | Sigma  |
| N,N,N',N'-Tetramethyl-<br>äthylendiamin              | Serva  |
| Thymidin                                             | Serva  |
| Triton X100                                          | Serva  |
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl<br>Beta-D-Galaktosid (Xgal) | Biomol |

#### Restriktionsenzyme

|          |            |
|----------|------------|
| Acc I    | Biolabs    |
| Bam HI   | Boehringer |
| Bgl II   | Boehringer |
| Eco RI   | BRL        |
| Hind III | Boehringer |
| Hinf I   | BRL        |
| Pst I    | BRL        |
| Xho I    | BRL        |

## Sonstige Enzyme

|                  |                     |
|------------------|---------------------|
| DNA Polymerase I | New England Nuclear |
| DNase I          | Boehringer          |
| Lysozym          | Boehringer          |
| Proteinase K     | Merck               |
| RNase A          | Boehringer          |
| SI Nuklease      | PL Biochemicals     |
| Trypsin          | Seromed             |

## 1.2 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden bei folgenden Herstellern bezogen:

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| alpha ( $^{32}\text{P}$ )-dCTP | Amersham |
| L-( $^{35}\text{S}$ )-Cystein  | NEN      |

## 1.3 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

E.coli POP 13B (lyc7, hsdR, hsdM, recA) (erhalten von  
Dr. N. Murray)

E.coli HB 101 (hsdR, hsdM, recA, gal, lac, pro, leu, rpsL)  
(Geschenk von Prof. H. Schmieger)

E.coli C600 (trp, thy, leu, his, recA) (Appleyard et al., 1954)

E.coli ED 8538 ( $\text{sup}^{\text{O}}$ , recA) (Murray et al., 1977)

E.coli BHB 2688 (=N205 recA (imm434, cIts, b2, red3, Eam15,  
Sam7)/Lambda) (Hohn, 1979)

E.coli BHB 2690 (=N205 recA (imm434, cIts, b2, red3, Dam15,  
Sam7)/Lambda) (Hohn, 1979)

Lambda NM 728 (Murray et al., 1977)

Lambda NM 762 (Murray et al., 1977)

pBR322 (Bolivar et al., 1978)

pBR327 (Soberon et al., 1980)

pAG0 (Colbere-Garapin et al., 1979)

pFG5 (Colbere-Garapin et al., 1979)

H-1 (Ellis et al., 1981)

pAO1-HBV (Cummings et al., 1980)

pKK92c (Wang et al., 1982)

#### 1.4 Zelllinien

| <u>Zelllinie</u> | <u>Herkunft</u>                                | <u>Literatur</u>              |
|------------------|------------------------------------------------|-------------------------------|
| PLC/PRF/5        | primäres, humanes<br>hepatozelluläres Karzinom | Alexander et al.<br>(1976)    |
| NIH 3T3          | Mausfibroblast                                 | Aaronson and<br>Todaro (1968) |
| LTk <sup>-</sup> | Mausfibroblast                                 | Kit et al.<br>(1963)          |

## 1.5 Tumor- und Peritumorgewebe

## Tumor

| <u>Patient</u> | <u>Code</u> | <u>Herkunft</u> | <u>erhalten von</u>     |
|----------------|-------------|-----------------|-------------------------|
| W1             |             | BRD             | Dr. R. Müller, Hannover |
| U1             |             | USA             | Dr. M. Tong, Pasadena   |
| D19            |             | Senegal         | Dr. F.Barin, Tours      |
| F1             |             | Frankreich      | "                       |
| T1             | GE 773      | Taiwan          | Dr. R.P.Beasley, Taipei |
| T2             | HEP 18735   | Taiwan          | "                       |
| T3             | GE 55       | Taiwan          | "                       |
| T5             | HEP 9867    | Taiwan          | "                       |
| T6             | HEP 18087   | Taiwan          | "                       |

## Peritumor

| <u>Patient</u> | <u>Code</u> | <u>Herkunft</u> | <u>erhalten von</u>     |
|----------------|-------------|-----------------|-------------------------|
| D11            |             | Senegal         | Dr. F.Barin, Toulouse   |
| D19            |             | Senegal         | "                       |
| T1             | GE 773      | Taiwan          | Dr. R.P.Beasley, Taipei |
| T2             | HEP 18735   | Taiwan          | "                       |
| T3             | GE 55       | Taiwan          | "                       |
| T4             | HEP 15616   | Taiwan          | "                       |
| T5             | HEP 9867    | Taiwan          | "                       |
| T6             | HEP 18087   | Taiwan          | "                       |
| T7             | HEP 4273    | Taiwan          | "                       |
| T8             | HEP 16287   | Taiwan          | "                       |
| T9             | GE 407      | Taiwan          | "                       |

## 1.6 Mäuse

NMRI nu/nu Mäuse wurden in der Zuchtkolonie in Martinsried gezogen.

## 1.7 Medien

|                        |                                                                                                                      |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB-Medium (auf 1l)     | 10 g Bactotrypton<br>5 g Hefeextrakt<br>5 g NaCl                                                                     |
| LB-Platten             | LB-Medium<br>1,5% Difco Agar                                                                                         |
| Xgal Indikator Platten | LB-Medium<br>1,5% Difco Agar<br>1 mM Isopropylthiogalaktosid<br>30 mg/l Xgal(in Dimethylformamid)                    |
| LB-Weichagar           | LB-Medium<br>0,7% Difco Agar                                                                                         |
| LB-Agarose             | LB-Medium<br>0,7% Seakem Agarose                                                                                     |
| PBS (auf 1l)           | 8 g NaCl<br>0,2 g KCl<br>1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$<br>0,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ |

Falls erforderlich, wurde den LB-Medien folgende Menge Antibiotika beigesetzt:

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Ampicillin               | 30 ug/ml  |
| Chloramphenicol          | 170 ug/ml |
| Kanamycin-Sulfat         | 25 ug/ml  |
| Tetracyclin-Hydrochlorid | 100 ug/ml |

Alle Puffer sind im Methodenteil angegeben.

### 1.8 Sonstiges

|                                             |                       |
|---------------------------------------------|-----------------------|
| Nitrozellulosefilter<br>(Porengröße 0.45µM) | Millipore             |
| Szintillationsreagens<br>(Quickszint 501)   | W. Zinsser, Frankfurt |
| Röntgenfilm XAR 5                           | Kodak                 |
| DNA, aus Lachssperma                        | Serva                 |
| Lambda DNA                                  | Boehringer            |
| HBsAg Radioimmunassay kit<br>(AUSRIA II)    | Abbott                |
| HBeAg Radioimmunassay kit<br>(ABBOTT-HBe)   | Abbott                |

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck bezogen. Die folgenden Materialien waren Geschenke: T4 Ligase (Dr. V. Pirrotta, EMBL, Heidelberg); humanes anti-HBs positives Serum (Max-von-Pettenkofer-Institut); Standard zur Quantifizierung von HBsAg (Paul-Ehrlich-Institut); pAO1-HBV Plasmid (Dr. J. Summers); pAGO (Prof. P. Kourilsky); E.coli HB101 (Prof. H. Schmieger, München); E.coli POP 13B (Dr. N. Murray, EMBL, Heidelberg).

## 2. METHODEN

### 2.1 DNA Isolierung

#### 2.1.1 Isolierung chromosomaler DNA

Hochmolekulare chromosomale DNA wurde aus kultivierten Zellen nach der Methode von Perucho et al. (1981) isoliert. Zellrasen von  $10^7$  oder mehr Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert und für 5 Min. bei 200g sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 5 Volumen 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH=7,5 aufgenommen, zu einer Endkonzentration von 0.2 mg/ml Proteinase K und 0.4% SDS gebracht, 20 Min. bei 68°C und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe einer gleichen Menge 650 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH=8,0 wurde die Lösung dreimal mit einem gleichem Volumen von TE-gesättigtem Phenol (TE=10 mM Tris/HCl pH=8,0; 1 mM EDTA), einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1) und zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) ausgeschüttelt. Die Phasen wurden jeweils durch Zentrifugierung (5000 rpm, SS34 Rotor, 5 Min.) getrennt. Nun wurde der wässrige Überstand auf 0.3 M Natriumazetat eingestellt und die DNA mit zweieinhalb Volumen Äthanol gefällt. Nach Inkubierung bei -20°C für einige Minuten wurde das DNA-Knäuel entnommen, vakuumgetrocknet und in TE-Puffer gelöst (1-5 mg DNA/ml). Ein dreißigminütiger Verdau mit RNase A (100 ug/ml), die vorher 30 Min. bei 68°C inkubiert worden war, hydrolisierte die verbliebene RNA. Nach einer weiteren Äthanolgefällung und Lösen in TE-Puffer wurde die DNA bei 4°C oder -20°C aufbewahrt. Um Konzentration und Proteingehalt zu bestimmen, wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Gewebe wurden mit einer Schere klein geschnitten, in hypotonischem Puffer (10 mM Tris/HCl pH=7,5; 10 mM KCl; 1,5 mM Magnesiumazetat) aufgenommen und ca. 10-20 Mal in einem "Dounce homogenizer" homogenisiert. Dann wurde wie mit oben beschriebenen Zellsedimenten verfahren.

### 2.1.2 Präparative Isolierung von Plasmid DNA

11 LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit 10 ml einer frischen konzentrierten Übernachtskultur von plasmidhaltigen E.coli Bakterien angeimpft und bei 37°C bis O.D.<sub>650</sub>=0,8 wachsen gelassen. Nach Zugabe von Chloramphenicol (200 µg/ml) wurde weitere 24-40 h geschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (5000 rpm, GSA Rotor, 10 Min., 4°C), in 150 ml TES-Puffer (50 mM Tris.HCl pH=8,0; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl) resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 10 ml einer eiskalten Sukrose-Lösung (25% Sukrose, 50 mM Tris/HCl pH=8,0) resuspendiert und 30 Min. auf Eis stehengelassen. Die Lyse der Zellen erfolgte bei 4°C: Zunächst wurden 2 ml einer frisch zubereiteten Lysozymlösung (5 mg Lysozym/ml in 250 mM Tris/HCl pH=8,0) zugegeben. Nach 10 Min. wurden 4 ml einer EDTA-Lösung (250 mM Tris/HCl pH=8,0) und nach weiteren 10 Min. 16 ml einer Triton X100 Lösung (in 50 mM Tris/HCl pH=8,0; 60 mM EDTA) zugegeben. 20 Min. später wurden Bakterientrümmern abzentrifugiert. Zu dem Überstand (dem klaren Lysat) wurden 0.9 g/l CsCl und, nachdem sich dies gelöst hatte, Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 500 µg/ml gegeben. Der Brechungsindex wurde mit CsCl auf 1,395 eingestellt. Nun wurde 30 Min. bei 16000 rpm in einem SS34 Rotor bei 10°C zentrifugiert, wonach die meisten Proteine am oberen Rand des Röhrchens flotierten. Nach Entfernung dieser Proteinschicht wurde eine Dichtegradientenzentrifugierung (vTi50 Rotor, 16 h, 45000 rpm, 15°C) durchgeführt, durch die chromosomale (obere Bande) von Plasmid DNA (untere Bande) getrennt wurde. Die Plasmid DNA

ließ sich nun durch Abzapfen mit einer Nadel isolieren. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde dreimal mit wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt. Dann wurde über Nacht unter mehrfachem Pufferwechsel gegen TE-Puffer dialysiert (die Dialyseschläuche waren 10 Min. in 0.5% SDS und 10 Min. in 10 mM EDTA gekocht worden), zweimal mit Äthanol gefällt und in TE-Puffer gelöst.

### 2.1.3 Schnellpräparation von Plasmid DNA (Birnboim & Doly, 1979)

Bakterien wurden in 20 ml Kulturen mindestens 12 h wachsen gelassen und dann im Eisbad abgekühlt. Von jeder Kultur wurde 1 ml in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und abzentrifugiert (5000 rpm, SS34 Rotor, 2 Min, 4°C). Die sedimentierten Bakterien wurden bei 4°C in 100 µl frisch hergestelltem Lysozymmix (2 mg Lysozym/ml, 50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl pH=8) resuspendiert und 30 Min stehengelassen. Es wurden 200 µl alkalische SDS-Lösung (1% SDS; 0,2 M NaOH) und 5 Min. später 170 µl 3 M NaAcetat (pH=4,8) zupipettiert und stark geschüttelt. Nach einer Stunde wurde die Suspension zentrifugiert (16000 rpm, SS34 Rotor, 5 Min., 5°C) und 400 µl des Überstandes zweimal mit Äthanol gefällt und in 40 µl TE-Puffer gelöst. 10 µl reichten für eine gelelektrophoretische Analyse aus.

### 2.1.4 Präparative Isolierung von Lambda DNA

11 LB-Medium, welches zusätzlich 10 mM  $MgSO_4$  und 1% Maltose enthielt, wurde mit 1 ml einer frischen E.coli Übernachtskultur (ca.  $1-2 \times 10^9$  Zellen/ml) und  $1-3 \times 10^8$  Lambdaphagen angeimpft und bei 37°C wachsen gelassen. Nach heftigem Schütteln für 6-8 h waren die Bakterien lysiert (Fetzen erkennbar). Nach Zugabe von 2 ml Chloroform wurde

für weitere 10 Min. geschüttelt. Zelltrümmer wurden nach Abkühlung im Eisbad abzentrifugiert und der Überstand bei 4°C aufbewahrt. In der Phagensuspension wurde nun NaCl (40 mg/ml) gelöst, DNase und RNase (Endkonzentration jeweils 1 µg/ml) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Phagen wurden aus dem Überstand gefällt durch Zugabe von 100 mg/ml vorher in Wasser gelöstem Polyäthylenglycol 6000, welches mit einem Magnetrührer über Nacht langsam verrührt wurde. Die Phagen wurden durch Zentrifugierung (10000 rpm, Sorvall, 10 Min, 4°C) sedimentiert und in 20 ml Phagenpuffer (auf 1l: 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 g NaCl, 10 ml 0,1 M  $\text{MgSO}_4$ , 10 ml 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ ) aufgenommen. Nach viermaligem Ausschütteln mit Chloroform wurde die Phagensuspension auf einen CsCl-Stufengradienten gegeben, der aus CsCl-Lösungen der Dichten 1.45, 1.5, und 1.7 g/ml in 20 mM Tris/HCl pH=7,5, 10 mM  $\text{MgSO}_4$  bestand, und zentrifugiert (SW27 Rotor, 26000 rpm, 15°C, 2 h). Die bei ca. 1,5 g CsCl/ml bandierenden Phagen wurden mit einer Nadel abgezapft. Die Phagen wurden in 20 ml Phagenpuffer aufgenommen, mit CsCl auf eine Dichte von 1.45 g/ml eingestellt und erneut zentrifugiert (Ti50.2 Rotor, 35000 rpm, 15°C, 18 h). Nach Isolierung der Phagenbande wurde Proteinase K (0.5 mg/ml) zugegeben und dreimal 30 Min. gegen TE-Puffer dialysiert. Daraufhin erfolgten zwei Phenol- und zwei Ätherextrahierungen und zwei Äthanol-fällungen zur Reinigung der DNA, die am Ende in TE-Puffer gelöst wurde.

#### 2.1.5 Schnellpräparation von Lambda DNA

Um Lambda DNA innerhalb von zwei Tagen zu isolieren, wurde die Methode von Cameron et al. (1977) verwendet. Ein frisches Plattenlysat wurde mit 4 ml einer kalten 20 mM Tris/HCl pH=7,4, 10 mM  $\text{MgSO}_4$  Lösung überschichtet und bei 4°C über Nacht stehengelassen. Zu der Phagensuspension wurde ein Tropfen Chloroform gegeben und Bakterientrümmer bei

9800g abzentrifugiert. Zu 800  $\mu$ l Überstand wurden 160  $\mu$ l "SDS-Mix" (0.25 M EDTA; 0.5 M Tris/HCl pH=9,0; 25 mg/ml SDS) gegeben und 30 Min. bei 68°C inkubiert. Das Gemisch wurde auf 4°C abgekühlt und 200  $\mu$ l einer 8 M Kaliumazetat Lösung zugegeben, um SDS-Protein Komplexe auszufällen. Nach 15 Min. bei 4°C wurde 30 Min. bei 9800g abzentrifugiert. Nach einer zweiten Zentrifugierung für 5 Min. wurde die DNA im Überstand zweimal mit Äthanol gefällt und in TE-Puffer gelöst.

## 2.2 Verdau mit Restriktionsenzymen

In einem typischen Ansatz wurden zu 0.5-1  $\mu$ g Lambda oder Plasmid DNA 2  $\mu$ l 10x Verdauungspuffer (siehe unten), 2  $\mu$ l 10x BSA Lösung (100 mg/l) und die für eine vollständige Spaltung notwendige Menge an Restriktionsenzym in einem Volumen von 20  $\mu$ l gegeben. Folgende Verdauungspuffer wurden verwendet:

| <u>Enzym</u> | <u>Puffer</u>                                                                        |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Acc I        | 10 mM Tris/HCl pH=7,5; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>1 mM Dithiothreitol              |
| BamHI,       | 50 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH=7,5;                                                   |
| Bgl II,      | 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM Dithiothreitol                                        |
| Eco RI,      |                                                                                      |
| Hind III     |                                                                                      |
| Hinf I       | 100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH=7,5;<br>10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM Dithiothreitol |
| Pst I,       | 50 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH=8; 10 mM MgCl <sub>2</sub>                             |
| Xho I        |                                                                                      |

Der Verdau erfolgte für 1-2 h bei 37°C. Wenn ein kompletter Verdau für analytische Zwecke notwendig war,

wurden manchmal Enzymmenge oder Dauer des Verdaus überschritten. Wenn später eine Ligierung erfolgen sollte, wurde die Minimaldauer für eine vollständige Spaltung durch Agarosegel-Elektrophorese ermittelt, um die in vielen Restriktionsenzymen enthaltene Exonukleaseaktivität möglichst gering zu halten. Zelluläre DNA wurde in der Regel mit 2-3 Enzymeinheiten/ug DNA 2-3 h lang verdaut.

Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen bei 68°C inaktiviert. Verdaus mit mehreren Restriktionsenzymen, die bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen arbeiten, wurden mit der niedrigsten Salzmenge begonnen, dann das Enzym inaktiviert und neuer Puffer und neues Enzym zugegeben.

## 2.3 Agarosegel-Elektrophorese (DNA)

Mittels Elektrophorese durch 0.3-2% Agarosegele können DNA Fragmente von 0,1-50 kb gut aufgetrennt werden (Maniatis et al., 1982). In dieser Dissertation wurden Gele der Konzentrationen 0,7%, 1% und 2% verwendet, welche in den Bereichen 0,7-8 kb, 0,5-7 kb und 0,1-3 kb effizient auftrennen. Als Längenstandards wurden für den Bereich 0,5-23 kb Hind III verdaute Lambda DNA (Fragmente: 23,7, 9,46, 6,67, 4,46, 2,25, 1,96, 0,59 und 0,1 kb, Abb. 9) und für den Bereich 0,1-0,5 kb Hinf I verdautes pBR322 (Fragmente 1631, 510, 510, 396, 344, 298, 221, 220 und 146 bp, Abb.9) verwendet. Analytische Gele wurden auf folgende Weise hergestellt: Die Agarose wurde in 0,9 Volumen H<sub>2</sub>O 3 Min. gekocht und auf 65°C abgekühlt, worauf 0,1 Volumen 10x Lönings Puffer (1xLönings Puffer=36 mM Tris/HCl; 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 1 mM EDTA; pH=7,8) und Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 ug/ml zugesetzt wurden. Nach dem Gießen wurde das Gel für mindestens 2 h stehengelassen. Die

Elektrophorese fand bei 45 V für 15 h oder bei 100 V für 5 h statt. Für präparative Gele wurde statt Lönings Puffer Tris-Azetat Puffer (40 mM Tris/HCl pH=7,5; 18 mM NaCl; 20 mM NaAzetat; 2 mM EDTA) verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung angefärbt. Die Elektrophorese 0,8-1 prozentiger Gele wurde in horizontaler, die zweiprozentiger Gele in vertikaler Lage durchgeführt.

Vor dem Auftragen wurde die DNA Lösung 10 Min. bei 68°C erhitzt und mit 0,1 Volumen Sukrose/Bromphenolblaulösung (10xLösung=0,5 g/ml Sukrose; 3,7 mg/ml EDTA; 0,18 g/ml Harnstoff; 2,5 mg/ml Bromphenolblau) gemischt. In der Regel wurden 0,5-1 µg Plasmid- oder Phagen DNA bzw. 10-20 µg genomischer DNA aufgetragen. Die aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids bei kurzweiligem uv Licht fluoreszierenden DNA-Banden wurden durch einen Rotfilter mit Polaroid- oder Ilford PANF Film photographiert.

#### 2.4 Elektroelution von DNA-Fragmenten

Nach präparativer Agarosegel-Elektrophorese wurden DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Agarosestücke in einen Dialyseschlauch eingeführt. Nach Zupipettierung eines möglichst geringen Volumens von Tris-Azetat Puffer wurde der Dialyseschlauch in eine Elektrophoresekammer eingelegt und die DNA durch weitere Elektrophorese aus dem Gel eluiert. Um Agarosereste abzutrennen, die bei späteren enzymatischen Reaktionen stören würden, wurde die DNA-Lösung mit TE-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt, während der Phasenmischung in flüssigem N<sub>2</sub> eingeforen und sofort bei 9800g für 3 Min. zentrifugiert. Am Boden befindliches kristallines Phenol enthielt Agarosereste. Der Überstand wurde erneut auf

gleiche Weise behandelt, zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt, zweimal mit Äthanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

## 2.5 Nick Translation

Mittels Nick Translation (Rigby et al, 1977) kann doppelsträngige DNA mit  $^{32}\text{P}$ -dNTP zu hoher spezifischer Aktivität radioaktiv markiert werden. Es wurden dabei ausschließlich durch präparative Agarosegel-Elektrophorese gereinigte DNA Fragmente eingesetzt. Ein Standardansatz enthielt in 25  $\mu\text{l}$ :

|                                                 |                             |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|
| DNA                                             | 8 mg/l                      |
| Tris/HCl pH=7,5                                 | 50 mM                       |
| MgSO <sub>4</sub>                               | 10 mM                       |
| Dithiothreitol                                  | 1 mM                        |
| Rinderserumalbumin                              | 50 mg/l                     |
| dATP                                            | 32 $\mu\text{M}$            |
| dGTP                                            | 32 $\mu\text{M}$            |
| dTTP                                            | 32 $\mu\text{M}$            |
| alpha-( $^{32}\text{P}$ )-dCTP<br>(3000Ci/mmol) | 1,3 $\mu\text{M}$ (100 uCi) |
| DNA Polymerase I                                | $2 \times 10^6$ E./l        |
| DNase I                                         | 3,2 $\mu\text{g/l}$         |

Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 15°C. Um die spezifische Aktivität der  $^{32}\text{P}$ -markierten DNA zu bestimmen, wurde zunächst ein Aliquot dieser Lösung mit Trichloressigsäure gefällt, wobei nichteingebaute Nukleotide abgetrennt werden. Nach Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  TE-Puffer wurde 1  $\mu\text{l}$  mit 200  $\mu\text{l}$  "TCA-Stop-Lösung" (1xSSC, 1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin) auf Eis gemischt, 5  $\mu\text{l}$  einer

ultraschallbehandelten Lachssperma DNA (4 mg/ml) und 20  $\mu$ l eiskalter 60% TCA Lösung zugegeben und 15 Min. bei 4°C stehengelassen. Die Mischung wurde dann auf einen Nitrozellulosefilter gegeben und unter mehrmaligem Spülen mit 6% TCA abgesaugt. Der Filter wurde getrocknet und cpm wurden in Szintillationsflüssigkeit in einem Packard 3380 Beta Zähler bestimmt. Eine spezifische Aktivität von  $3-8 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g DNA wurde routinemäßig erreicht.

Die markierte DNA wurde durch eine Cetylmethylammoniumbromid- (siehe unten) und eine Äthanol-fällung von nichteingebauten Nukleotiden gereinigt. Bei 4°C wurden zu 99  $\mu$ l Nicktranslationsansatz 5  $\mu$ l einer 4 mg/ml Lachssperma DNA und 20  $\mu$ l einer 0,1 M CTAB Lösung gegeben und 1 h stehengelassen. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (10 Min., 9800g) und der Niederschlag in 100  $\mu$ l einmolarer NaCl resuspendiert. Nun wurde die DNA mit Äthanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

## 2.6 Hybridisierung mit DNA, immobilisiert auf Nitrozellulose

Um spezifische DNA-DNA Hybridisierungen durchzuführen, wurde die DNA zunächst durch Tüpfeltests, "Southern blotting" oder Plaque Tests auf Nitrozellulosefilter aufgetragen und durch "Backen", wie weiter unten beschrieben, immobilisiert.

### 2.6.1 Tüpfeltest ("Dot-blot")

10-20  $\mu$ l chromosomale DNA (10  $\mu$ g) oder klonierte DNA ( $\leq 1$   $\mu$ g) wurden mit NaOH (Endkonzentration: 0.2 n, 10 Min., 68°C) denaturiert und mit Essigsäure (Endkonzentration: 0,2 n) neutralisiert. Die DNA Lösung wurde auf einen Nitrozellulo-

sefilter aufgetropft, der zuvor 1 Min. lang in 2xSSC getränkt und getrocknet worden war. Nach Trocknen bei Raumtemperatur wurde der Filter ca. 3 h bei 80°C im Vakuum gebacken.

### 2.6.2 "Southern blot"

Mit dieser Methode kann DNA aus einem Agarosegel auf einen Nitrozellulosefilter übertragen werden. Dadurch entsteht ein genauer Abdruck des DNA-Bandenmusters.

Die Bandenpositionen der mit Ethidiumbromid gefärbten Längenstandard DNA wurden unter uv Licht durch Punktieren mit einer Pasteurpipette markiert. Die DNA im Gel wurde in situ einer milden Säurebehandlung unterzogen (2x15 Min. in 0,25 M HCl). Dann wurde die DNA denaturiert (2x20 Min. in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und neutralisiert (2x20 Min. in 0,5 M Tris/HCl pH=7,4; 1,5 M NaCl) und das Gel 10 Min. in 20xSSC gelegt. Die DNA wurde nun mit 20xSSC ca. 20 h lang auf einen Nitrozellulosefilter übertragen (Southern, 1975), wobei Ansaugpapier und 20xSSC mehrfach gewechselt wurden. Der Nitrozellulosefilter wurde eine Minute in 2xSSC gelegt und bei Raumtemperatur getrocknet. Unter uv-Licht konnten die markierten Positionen der Längenstandard DNA auf dem Filter erkannt und angezeichnet werden. Der Filter wurde ca. 3 h im Vakuum bei 80°C gebacken.

### 2.6.3 Plaque Test nach Benton und Davis

Diese Methode (Benton und Davis, 1977) erlaubt die Identifizierung von Plaques, die spezifische DNA Sequenzen enthalten.

Phagen wurden auf Weichagaroseplatten ausplattiert, sodaß

die Plaques vereinzelt vorlagen. Nach Erreichen der Maximalgröße der Plaques wurden die Platten 30 Min. bei 4°C kaltgestellt. Zwei Nitrozellulosefilter wurden übereinander auf eine Platte gelegt und mit einer Nadel zur Markierung mehrmals durch Filter und Agarose gestochen. Nach erneutem Kaltstellen für 30 Min. wurden die Filter abgenommen, denaturiert (2,5 Min. in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), neutralisiert (5 Min. in 1 M Tris/HCl pH=7,4; 1,5 M NaCl und 5 Min. in 0,5 M Tris/HCl pH=7,4; 1,5 M NaCl) und 3 h im Vakuum bei 80°C gebacken.

## 2.7 DNA-DNA Hybridisierung

Spezifische DNA-DNA Bindungen können zwischen DNA auf Nitrozellulosefiltern und  $^{32}\text{P}$ -markierter DNA eingegangen werden (Southern, 1975). Filter wurden in Plastiktüten eingeschweißt und bei 68°C in 5xSSC, 0,02% BSA, 0,02% Ficoll, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,05% SDS, 10 mM Tris/HCl pH=8,0, 1 mM EDTA (Denhardt, 1966) 1 h vorhybridisiert. Zusätzlich erhielt die Lösung 250 µg/ml 5 Min. lang gekochte Lachssperma DNA, die durch Ultraschallbehandlung auf eine durchschnittliche Länge von ca. 300 bp reduziert worden war. Nach einer Stunde wurde die Lösung durch eine identische Lösung ersetzt, die zusätzlich  $2 \times 10^6$  cpm/ml hitzedenaturierte (100°C, 5 Min.), nicktranslatierte DNA enthielt. Nach Hybridisierung für 24-36 h wurden die Filter 1-2 h unter häufigem Wechseln in 2xSSC, 0,5% SDS bei Raumtemperatur und dann zweimal 15 Min. in 0,1xSSC, 0,1% SDS bei 68°C (stringente Bedingungen) gewaschen. Sie wurden getrocknet und zwischen 30 Min. (klonierte DNA) und 1-7 Tagen (genomische DNA) bei -80°C exponiert. Dabei wurde Kodak XAR 5 Röntgenfilm und Ilford Verstärkerfolie verwendet.

In manchen Fällen wurden Filterstücke ausgestanzt und cpm

in einem Packard Betazähler bestimmt, um die gebundene Radioaktivität zu quantifizieren.

## 2.8 Klonierung in Lambda-Phagen

### 2.8.1 Ligierung

Vektor DNA (Lambda NM 728 oder NM 762) und Donor DNA (PLC/PRF/5) waren mit einer minimalen Menge Hind III vollständig gespalten und das Enzym durch zehnminütige Inkubierung bei 68°C inaktiviert worden. Ein typischer Ligierungs-Testansatz enthielt in 20 ul:

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| verdaute Lambda DNA    | 50 mg/l   |
| verdaute PLC/PRF/5 DNA | 150 mg/l  |
| Tris/HCl pH=7,5        | 66 mM     |
| MgCl <sub>2</sub>      | 10 mM     |
| EDTA pH=8,0            | 1 mM      |
| NaCl                   | 50 mM     |
| 2-Merkaptoäthanol      | 10 mM     |
| ATP pH=7,0             | 1 mM      |
| Ligase                 | 1000 E./l |

Nach dreistündiger Inkubierung bei 15°C wurde die Ligase durch fünfminütiges Erhitzen bei 68°C inaktiviert. Für die Herstellung der PLC/PRF/5 Genbanken wurden jeweils 5 ug Lambda-DNA (NM 728 oder NM 762) mit 15 ug PLC/PRF/5 DNA in 100 ul ligiert. Die ligierte DNA wurde mit Äthanol gefällt und in 20 ul TE-Puffer resuspendiert.

### 2.8.2 Herstellung von Verpackungsextrakten

Die E.coli Stämme BHB 2688 und BHB 2690 enthalten lysogene Lambda- Prophagen, die unter anderem jeweils einen

Defekt in einem verschiedenen Kopfprotein (E- bzw. D-Protein) haben. Aus diesen Stämmen wurden zwei einander komplementierende Verpackungsextrakte ("Frier-Tau Lysat" und "Ultraschallextrakt") nach der Methode von Hohn (1979) mit einigen Veränderungen hergestellt. Eine Vermischung beider Extrakte mit Lambda DNA liefert intakte Phagen.

(a) Frier-Tau Lysat ("Freeze-Thaw Lysate"-FTL)

Eine Einzelkolonie von E.coli BHB 2688 Zellen wurde auf zwei Agarplatten ausgestrichen, die anschließend bei 32°C und 42°C inkubiert wurden. Wenn auf der 32°C Platte, nicht aber auf 42°C Platte Bakterien wuchsen, wurden 400 ml LB Medium mit ca. 5 Impfösen dieser Zellen angeimpft und bei 32°C bis O.D.<sub>650</sub>=0,4 wachsen gelassen. Die lysogenen Phagen wurden nun bei 45°C 15 Min. lang induziert und weitere 3 h sehr heftig geschüttelt. Die Suspension wurde in Eiswasser abgekühlt und abzentrifugiert (6500 rpm, GSA Rotor, 10 Min.). Nachdem auch die letzten Tropfen des Überstandes entfernt worden waren, wurde der Niederschlag in 0,5 ml kalter 10% Sukrose, 0,05 M Tris/HCl pH=7,4 resuspendiert und jeweils ca. 0,5 ml dieser Suspension in ein eiskalte 10 ml Oak ridge Zentrifugenröhrchen (Polykarbonat) gefüllt. Nach Zugabe von 30 ul frischer Lysozymlösung (2 mg Lysozym/ml in 10% Sukrose, 0,05 M Tris/HCl pH=7,4) wurde die Suspension sofort in N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80°C über Nacht oder länger aufbewahrt. Dann wurden die Röhrchen auf Eiswasser aufgetaut, 125 ul M1 Puffer (2% 2-Merkaptoäthanol; 6 mM Tris/HCl pH=7,4; 30 mM Spermidin (pH=7,0); 60 mM Putrescin (pH=7,0); 18 mM MgCl<sub>2</sub>; 15 mM ATP) zugegeben und Zelltrümmer abzentrifugiert (35000 rpm, Ti50 Rotor, 25 Min., 2°C). Der Überstand wurde in 50 ul pro Eppendorf- Röhrchen abgefüllt und in N<sub>2</sub> eingefroren. FTLs konnten zwei Jahre ohne Aktivitätsverlust bei -80°C aufbewahrt werden.

## (b) Ultraschallextrakt ("Sonic extract"-SE)

E.coli BHB 2690 Zellen wurden induziert und sedimentiert wie unter "Freeze-Thaw Lysate" beschrieben. Der Niederschlag wurde in 3 ml Puffer A (20 mM Tris/HCl pH=8,0; 3 mM  $MgCl_2$ ; 10 mM 2-Merkaptoäthanol; 1 mM EDTA) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (pulsierend, ca. 15 Min.) lysiert. Zum Überstand einer Zentrifugierung (10 Min., 6000 rpm, SS34 Rotor) wurde 0,6 ml M1 Puffer gegeben und in 25  $\mu$ l pro Eppendorf-Röhrchen in  $N_2$  eingefroren. Die Aktivität blieb für mindestens zwei Jahre erhalten.

### 2.8.3 Verpackung und Ausplattierung

In Testansätzen wurden nach Auftauen der Verpackungsextrakte zuerst 2  $\mu$ l SE mit 1  $\mu$ l Lambda DNA (ca. 100 ng) eine Minute langsam verrührt. Nach Zugabe und Verrührung von 10  $\mu$ l FTL wurde die Mischung 60 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen und dann 300  $\mu$ l Phagenpuffer zugegeben. Die Phagen wurden in Phagenpuffer weiter verdünnt und zu 0,2 ml Bakterien gegeben. Bakterien waren grundsätzlich am selben Tag gezüchtet worden. 100 ml Bakterien bei  $O.D._{650}=0,6$  waren sedimentiert (5000 rpm, SS34 Rotor Min.) und in 10 ml kaltem 10 mM  $MgSO_4$  resuspendiert worden.

Zur Adsorption wurde das Bakterien-Phagen Gemisch 10 Min. bei 37°C inkubiert und auf Agarplatten ausplattiert. Es wurden immer Doppelansätze verwendet. Als Kontrolle wurden ungeschnittene und verdaute Lambda DNA und Bakterien ohne Phagen ausplattiert. Wenn die Plaques später auf Nitrozellulosefilter übertragen werden sollten, wurden Weichagarose- statt Weichagarplatten verwendet. Um das Verhältnis von rekombinanten zu nichtrekombinanten Phagen zu bestimmen, wurde Lambda NM 762 mit E.coli ED 8538 Zellen auf Xgal Platten ausplattiert, welche aufgrund des supF Gens

eine Unterscheidung zulassen (Erklärung siehe Ergebnisse). Lambda NM 728 wurde in Testansätzen auf E.coli C600 plattiert.

Für die PLC/PRF/5 Genbanken wurden jeweils 0,5 µg Lambda DNA mit 2 µl SE und 10 µl FTL verpackt und titriert. Auf 10 Agarplatten (441 cm<sup>2</sup>), die 300 ml LB-Agar enthielten, wurden jeweils 10<sup>5</sup> Lambda NM 762 Phagen mit 35 ml Agarose und 1,2 ml E.coli HB 101 Bakterien ausplattiert. 10<sup>7</sup> Lambda NM 728 Phagen wurden gleichermaßen, allerdings in höherer Dichte (5x10<sup>5</sup> pfu/Platte) und auf E.coli POP 13B plattiert.

## 2.9 Klonierung in Plasmiden

### 2.9.1 Ligierung

Die Konzentration der DNA Fragmente wurde nach der Theorie von Dugaiczky et al. (1975), nach der der Anteil rekombinanter, ligierter Plasmide optimiert werden kann, bestimmt. Die zu verknüpfenden DNA Fragmente wurden zusammenpipettiert, 10 Min. auf 65°C erhitzt und auf 0°C abgekühlt. Folgende Bedingungen wurden für die Ligierung gewählt:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| ATP pH=7,0        | 0,2 mM |
| Tris/HCl pH=8,0   | 60 mM  |
| MgCl <sub>2</sub> | 6 mM   |
| Dithiothreitol    | 10 mM  |

2 Einheiten T4 Ligase pro pmol DNA wurden zupipettiert und 3 h bei 4°C inkubiert.

### 2.9.2 Transformation von E.coli

Zur Aufnahme von DNA wurden Bakterien wie folgt kompetent gemacht: Sie wurden in 100 ml antibiotikahaltiges LB-Medium bis  $OD_{650}=0.6$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  gezogen, 30 Min. auf Eis stehengelassen und abzentrifugiert (5000 rpm, Sorvall, 5 Min.). Nach zweifachem Waschen für 5 Min. in 50 ml 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  und Abzentrifugieren wurden die Bakterien in 10 ml 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und 20 Min. auf Eis stehengelassen.

Zur Transformation wurden 100  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension mit 100  $\mu\text{l}$  TCM (10 mM Tris pH=7,5; 10mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) und 1-10  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (2-20 ng) gemischt und 30 Min. auf Eis gestellt. Die Mischung wurde 4 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  TMG-Medium (auf 1l: 10 g Baktotrypton; 2,5 g NaCl; 1 g  $\text{MgCl}_2$ ) wurde 30 Min. bei  $37^{\circ}$  inkubiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Es wurden in der Regel ca.  $10^5$  Kolonien pro  $\mu\text{g}$  DNA erhalten.

### 2.10 RNA Isolierung

Mindestens  $5 \times 10^7$  kultivierte Zellen wurden mit einem Gummischaber abgekratzt, zentrifugiert (200g, 5 Min.), mit PBS (siehe Material) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Zu dem Zellsniederschlag wurde 1 ml einer Guanidin-Isothiocyanatlösung gegeben (4 M Guanidin-Isothiocyanat; 5 mM Natriumzitat pH=7,0; 0,1 M 2-Merkaptoäthanol; 0,5% Sarkosyl) und durch Schütteln und Pipettieren verteilt. Das Gemisch wurde auf ein 1,5 ml CsCl Kissen (5,7 M CsCl; 0,1 M EDTA pH=7,5) in einem Beckman SW 51.1 Polyallomer Zentrifugenröhrchen gegeben und mit Guanidin-Isothiocyanatlösung bis zum Rand aufgefüllt. Nach einer Zentrifugierung (SW 50.1 Rotor; 40000 rpm;  $20^{\circ}\text{C}$ ; 15 h) wurde das

RNA-Sediment in Guanidin-HCl Lösung (7,5 M Guanidin-HCl; 1 M Natriumzitat pH=7,0; 5 mM Dithiothreitol) gelöst. Die RNA wurde mit Äthanol gefällt (wie DNA) und bei -80°C gelagert. Vor einem Versuch wurde sie abzentrifugiert (9800g; 15 Min.) und in Wasser gelöst.

## 2.11 Agarosegel-Elektrophorese (RNA)

RNA wurde durch Behandlung mit Glyoxal 15 Min. bei 50°C denaturiert. Der Inkubationsansatz enthielt:

|                                         |        |
|-----------------------------------------|--------|
| Dimethylsulfoxid                        | 15 ul  |
| Natriumphosphatpuffer<br>(0,5 M pH=6,5) | 0,6 ul |
| SDS                                     | 10 %   |
| Glyoxal                                 | 30 %   |
| RNA (in Wasser)                         | 8 ul   |

Vor dem Auftragen auf das Agarosegel wurde die Lösung gekühlt und 0,1 Volumen Sukrose/Bromphenolblaulösung (10xLösung=0,5 g/ml Sukrose; 3,7 mg/ml EDTA; 0,18 g/ml Harnstoff; 2,5 mg/ml Bromphenolblau) beigemischt. Das einprozentige Agarosegel wurde mit 10 mM Natriumphosphatpuffer hergestellt und in dem gleichen Puffer bei 15 V für 15 h laufen gelassen. Als Längenstandard wurde Hind III verdaut Lambda DNA verwendet. RNA und DNA wurden mit Ethidiumbromid angefärbt (0,5 ug/ml).

## 2.12 "Northern" blot

Analog zum oben beschriebenen "Southern" blot kann RNA aus einem Agarosegel auf einen Nitrozellulosefilter

übertragen werden (Thomas, 1980). Die RNA wurde für diesen Zweck nicht mit Ethidiumbromid angefärbt und ohne weitere Behandlung direkt mit 20xSSC (siehe "Southern" blot) auf einen Nitrozellulosefilter übertragen, der mit 20xSSC vorbehandelt war. Nach dreistündigem Backen im Vakuumofen wurde der Filter 5-10 Min. in 20 mM Tris/HCl pH=8,0 gekocht, um das Glyoxal zu entfernen. Hybridisiert wurde mit nick-translatierter DNA unter den für DNA-DNA Hybridisierung beschriebenen Bedingungen.

### 2.13 S1 Kartierung

Die S1 Kartierung des 5' Endes der HBsAg mRNA aus Ltk 2425 Zellen wurde nach der von Weaver & Weissmann (1979) beschriebenen Methode ausgeführt. pAl 10,7 wurde vollständig mit Acc I gespalten und überstehende 5' Enden mit  $^{32}\text{P}$  markiert (Maxam & Gilbert, 1980). Daraufhin wurde ein 1,9 kb Acc I - Acc I Fragment, das HBV und Plasmidsequenzen enthält, durch präparative Gelektrophorese aus pAl 10,7 isoliert. Dieses Segment wurde mit Sph I nachgespalten, um ein 1,8 kb Acc I - Sph I Fragment zu erhalten (siehe Abb. 31), das nur an einem Ende (Acc I Ende) markiert ist. 50000 cpm dieser DNA wurden mit 30 ug Gesamt RNA aus Ltk 2425 Zellen bei 53°C für 16 h in 20 ul Hybridisierungspuffer (40 mM PIPES (pH 6,4), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,4 M NaCl, 80% Formamid) hybridisiert. Als Negativkontrolle wurde eine gleiche DNA Menge mit 30 ug tRNA aus Hefe hybridisiert. Die entstandenen Hybride wurden mit verschiedenen Mengen (siehe Legende zu Abb. 30) S1 Nuklease für 30 Min. bei 37°C in 200 ul Nuklease S1 Puffer (0,28 M NaCl, 0,05 M Natrium Azetat pH 4,6, 4,5 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 20 ug/ml DNA aus Lachssperma) behandelt. Um die Reaktion zu beenden, wurden danach auf Eis 33,3 ul 4 M Ammonium Azetat, 0,1 M EDTA zugegeben. Nach alkalischer Hydrolyse der RNA (2 h bei 45°C) wurden die vom

Sl Verdau geschützten Fragmente auf einem sechsprozentigen Polyacrylamid Sequenzierungsgel aufgetrennt.

## 2.14 Zellkultur

PLC/PRF/5, Ltk<sup>-</sup> und NIH 3T3 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) gezogen. Das Medium enthielt 50 ug/ml Kanamycin-Sulfat und 10% fötales Kälberserum, welches 30 Min. bei 56°C inaktiviert worden war. Alle zwei bis drei Tage wurde Medium gewechselt. Ltk-positive Zellen wurden in HAT-Medium (auf 1l: 13,6 mg Hypoxanthin; 0,18 mg Aminopterin; 3,9 mg Thymidin) gezüchtet.

Das Passagieren der Zellen erfolgte folgendermaßen: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einem minimalen Volumen Trypsin (0,25%) überschichtet, 5-10 Min bei 37°C inkubiert, in Medium aufgenommen und auf einer größeren Oberfläche ausgesät.

Zellen wurden in DMEM, 10% DMSO, 15% Serum biologisch eingefroren.

## 2.15 Transfektion eukaryontischer Zellen

Zellen wurden nach der Calcium-Phosphat Methode transfiziert (Graham & van der Eb, 1973).  $5 \times 10^5$  Zellen (NIH 3T3 oder Ltk<sup>-</sup>) wurden in einer 6 cm Petrischale ausgesät. 20 ug durch Äthanol-fällung sterilisierte DNA (verschiedene Mengen Plasmid DNA, hochmolekulare Lachssperma-DNA; zusammen 20 ug) waren in 225 ul HBS-Puffer (auf 1l: 8 g NaCl; 0,38 g KCl; 0,19 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 1 g Glukose; 5 g HEPES) gelöst worden. Ca. 8-14 h nach dem Ausäen der Zellen wurden 25 ul

1.25 M  $\text{CaCl}_2$  zu der DNA-Lösung gegeben und nach mehrmaligem Schütteln 25 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach weiterem Schütteln wurde das Calcium-Phosphat-DNA Präzipitat auf die Zellmedien geträufelt und verteilt. 14 h später wurden die Zellen mehrmals mit Medium gewaschen, jede Schale trypsiniert und in drei Petrischalen verteilt. 14 Tage später waren NIH 3T3 Foci sichtbar. Ltk<sup>-</sup>-Zellen wurden 36-48 h nach der Transfektion in HAT-Medium überführt. Ltk-positive Kolonien wurden 14-17 Tage nach der Transfektion mit Klonierungszylindern isoliert, in Costar-Platten überführt und später als Massenkulturen gezogen.

#### 2.16 Radioimmunassay für HBsAg

HBsAg wurde mit dem AUSRIA II-125 Test (Abbott) aus Zellüberständen oder Mauseren bestimmt.

#### 2.17 Radioimmunassay für HBeAg

HBc/HBeAg wurde mit dem ABBOTT-HBe Test (Abbott) aus Zellüberständen, homogenisierten Zellen oder Mauseren bestimmt.

#### 2.18 <sup>35</sup>S-Markierung von Zellen

Ltk 2425 Zellen (Ltk<sup>+</sup>, die pA1 10,7 DNA integriert haben) wurden mit <sup>35</sup>S-Cys markiert. Eine T75 Flasche, die zu 80% vollgewachsen war, wurde dreimal mit PBS und zweimal mit Cystein- und Cystinfreiem Medium ausgewaschen, mit 5 ml dieses Mediums gefüllt und 1 h bei 37° inkubiert. Das Medium

wurde durch 3 ml Medium, welches 300 uCi  $^{35}\text{S}$ -Cys enthielt, ausgetauscht und die Zellen für 24 h inkubiert. Der Überstand wurde für HBsAg Bestimmung und Immunpräzipitation verwendet.

## 2.19 Proteinbestimmung

(Schaffner & Weissmann, 1973)

1-20  $\mu\text{l}$  Proteinlösung wurden in 300  $\mu\text{l}$  (0.1 M Tris/HCl pH=7,5; 0,1% SDS; 6% Trichloressigsäure) gefällt (5-15 Min. bei Raumtemperatur). Als Kontrolle diente eine Rinderserumalbuminlösung. Die Proben wurden auf einen Nitrozellulosefilter durch Absaugen auf einer Filterbank aufgetragen. Der Filter wurde zweimal mit 0,5 ml 6% TCA gewaschen, 3 Min. mit 0,1% Amidoschwarz (in 45% Methanol, 10% Essigsäure, 10%  $\text{H}_2\text{O}$ ) gefärbt, 3-4 Mal jeweils 1 Min. entfärbt (90% Methanol, 2% Essigsäure, 8%  $\text{H}_2\text{O}$ ) und zweimal in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die gefärbten, proteinhaltigen Punkte wurden ausgeschnitten und in jeweils 1 ml Eluierungslösung (25 mM NaOH, 0,05 mM EDTA, 50% Äthanol) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Bestimmung von  $\text{OD}_{630}$  konnten anhand einer Rinderserumalbumineichkurve die Proteinkonzentrationen bestimmt werden.

## 2.20 Immunpräzipitation

Nach  $^{35}\text{S}$ -Markierung des Antigens (HBsAg) und Proteinbestimmung von Antigen und Antikörper wurde die Reaktion folgendermaßen ausgeführt:  $1-5 \times 10^6$  cpm Antigen wurden auf Eis mit Antikörper im Verhältnis 1:10, 1:1 und 1:0,1 vermischt und auf 200  $\mu\text{l}$  mit "Immunpuffer" (50 mM Tris/HCl pH=7,5; 150 mM NaCl; 5mM EDTA; 0,5% NP40) aufgefüllt. Das Gemisch wurde 30 Min. bei  $37^\circ\text{C}$  und 30 Min. bei  $4^\circ\text{C}$

inkubiert. Nach Beimischung von 20  $\mu$ l Protein A Sepharose (in Immunpuffer) wurde für weitere 30 Min. bei 37°C und 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugierung (9800g, 2 Min.) wurde der Niederschlag dreimal mit 100  $\mu$ l Immunpuffer gewaschen bzw. zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50  $\mu$ l "Sample Puffer" (2% SDS; 25 mM Tris/HCl pH=6,8; 20 % Glycerin) aufgenommen.

## 2.21 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Ein 12,5% Gel wurde auf folgende Weise hergestellt: 12,5 ml (40% Acryl, 1% N,N' Methylenbisacryl), 10,5 ml H<sub>2</sub>O, 15 ml 1M Tris/HCl pH=8,7, 200  $\mu$ l SDS (20%) wurden vermischt und, um die Polymerisierung zu beginnen, 200  $\mu$ l Ammoniumpersulfat (10%) und 30  $\mu$ l N,N,N',N' Tetramethyläthylendiamin zugegeben. Nach Entgasen wurde eine vertikale Gelkammer zu zwei Dritteln mit dieser Mischung gefüllt und das Erstarren des Gels abgewartet. Das fünfprozentige Sammelgel wurde analog hergestellt: 1,3 ml (40% Acryl; 1% N,N', Methylenbisacryl), 7,4 ml H<sub>2</sub>O, 1,3 ml 1 M Tris/HCl pH=6,8, 50  $\mu$ l SDS (20%), 50  $\mu$ l Ammoniumpersulfat (10%), 8  $\mu$ l N,N,N',N' Tetramethyläthylendiamin. Die Gelkammer wurde mit dem Sammelgel aufgefüllt. Nach dem Erstarren wurde das Gel 3-6 h bei 5 mA in Elektrophoresepuffer (auf 1l: 30 g Tris/base; 144g Glycerin; 0,1% SDS) laufen gelassen. Zu den Proben (in "Sample Puffer") wurde 2-Merkaptoäthanol (Endkonzentration 5%) gegeben und die Proben für 5 Min. gekocht. Die Elektrophorese wurde ca. 14 h bei 7-8 mA in Elektrophoresepuffer ausgeführt.

Zur Fluorographie wurde das Gel 2x30 Min. in Dimethylsulfoxid und 3 h in 2,5 Diphenyloxazol (PPO) + Dimethylsulfoxid (DMSO) gelegt. Nach Waschen für 30 Min. in H<sub>2</sub>O und 30 Min. in 10% Essigsäure, 1% Glycerin, 89% H<sub>2</sub>O wurde das Gel

getrocknet und mit Kodak XAR 5 Film bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für 1-7 Tage autoradiographiert.

## 2.22 Reinigung von HBsAg Partikeln

Der Überstand von Ltk 2425 Zellen wurde für 24 h bei 15000 g zentrifugiert, der Niederschlag in Medium aufgenommen und daraufhin in einem CsCl Dichtegradienten (1,2 g CsCl/ml; Brechungsindex=1,416) zentrifugiert (45000 rpm, SW41 Rotor, 60 h,  $17^{\circ}\text{C}$ ). 0,5 ml Fraktionen wurden gesammelt und Dichte und HBsAg Gehalt (AUSRIA-II-125) bestimmt. HBsAg-enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und mit 10% Polyäthylenglykol 6000 gefällt (1 h bei  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 Min. in einem SS34 Rotor bei 10000 rpm zentrifugiert). Der Niederschlag wurde in PBS aufgenommen.

## 2.23 Elektronenmikroskopie

Proben wurden von I. Scholz auf kohlebeschichtete Kupfernetze adsorbiert und mit 2% Uranylformiat kontrastiert. Die Netze wurden in einem Siemens Elmiskop 102 betrachtet.

## 2.24 Inokulation von Mäusen und Ernte von Tumoren

4-6 Wochen alte männliche NMRI nu/nu Mäuse wurden mit  $7 \times 10^6$  PLC/PRF/5 Zellen (in PBS) subkutan im Rücken inokuliert. Nach 4-6 Wochen wurden 1-2g große Tumoren und Seren (aus der Vena cava) geerntet. Die Tumoren wurden mit einer Schere zerkleinert und in hypotonischem Puffer (siehe

"DNA-Isolierung") in einem "Dounce homogenizer" homogenisiert. Dieser Prozeß wurde mittels Objektträger und Lichtmikroskop verfolgt, um sicherzugehen, daß die Zellen vollständig homogenisiert waren.

#### 2.25 CsCl Zentrifugierung des Tumorhomogenats

Die isopycniche Gleichgewichtszentrifugierung (1,3 g CsCl/ml; in hypotonischem Puffer) wurde in einem Beckman SW 60 Rotor bei 45000 rpm für 60 h bei 17°C ausgeführt. Fraktionen von 450 ml wurden vom Boden des Röhrchens entnommen.

#### 2.26 Sicherheit

Alle Arbeiten mit rekombinanten Bakteriophagen oder Plasmiden, die HBV-spezifische DNA-Sequenzen enthielten, wurden im L3 Labor der Abteilung Virusforschung im Max-Planck-Institut für Biochemie ausgeführt.

## F. LITERATUR

Aaronson SA & Todaro GJ. (1968) Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro Science 162, 1024-1026

Acs G, Ostrove S, Flordellis C, Price P, Chen M-L, Thung S, Gerber M & Christman JK. (1983) Differential expression of hepatitis B virus antigens in 3T3 cells transformed by a dominant acting gene and cloned HBV DNA. in "Viral Hepatitis" (Overby LR, Deinhardt F & Deinhardt J) pp. Marcel Dekker Inc, New York

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I & Knowles BB. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature 282, 615-616

Albin C & Robinson WS. (1980) Protein kinase activity in hepatitis B virus. J. Virol. 34, 297-302

Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW & Lecatsas G. (1976) Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. S. Afr. Med. J. 50, 2124-2128

Appleyard RK. (1954) Segregation of lambda lysogenicity during bacterial recombination in E.coli K12. Genetics 39, 429-439

Barker LF, Chisari F & McGrath PP. (1973) Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. J. Infect. Dis. 12, 648-652

Bassendine MF, Della Seta L, Salmeron J, Thomas HC &

Sherlock S. (1983) Incidence of hepatitis B virus infection in alcoholic liver disease, HBsAg negative chronic active liver disease and primary liver cell carcinoma in Britain. *Liver* 3, 65-70

Beasley RP. (1982) Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma - epidemiologic considerations. *Hepatology* 2, 21-26

Benedict WF, Murphee AL, Banerjee A, Spina CA, Sparkes MC & Sparkes RS. (1982) Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science* 219, 973-975

Benton WD & Davis RW. (1977) Screening of recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196, 180-182

Berk AJ & Sharp PA. (1978) Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease--digested hybrids. *Cell* 12, 721-732

Birnboim HC & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.* 7, 1513-1523

Blum HE, Stowring L, Figus A, Montgomery CK, Haase AT & Vyas GN. (1983) Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocytes, bile duct epithelium, and vascular elements by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6685-6688

Blumberg BS, Alter HJ & Visnich S. (1965) A new antigen in leukemia sera *J. Am. Med. Ass.* 191, 541-546

Bolivar F, Rodriguez RL, Betlach MC & Boyer HW. (1977)

Construction and characterization of new cloning vehicles.  
I. Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9 Gene  
2, 75-93

Brechot C, Hadchouel M, Scotto J, Fonck M, Potet F, Vyas  
GN & Tiollais P. (1981) State of hepatitis B virus DNA in  
hepatocytes of patients with hepatitis B surface  
antigen-positive and -negative liver diseases. Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 78, 3906-3910

Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B & Tiollais P.  
(1980) Presence of integrated hepatitis B virus DNA  
sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma.  
Nature 286, 533-535

Burrell CJ, MacKay P, Greenaway PJ, Hofschneider PH &  
Murray K. (1979) Expression in Escherichia coli of hepatitis  
B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR 322. Nature 279,  
43-47

Cameron JR, Philippsen P & Davis RW. (1977) Analysis of  
chromosomal integration and deletion of yeast plasmids.  
Nucl. Ac. Res. 4, 1429-1448

Cattaneo R, Will H, Darai G, Pfaff E & Schaller H. (1983)  
Detection of an element of the SV40 late promoter in vectors  
used for expression studies in COS cells. EMBO J. 2, 511-514

Cattaneo R, Will H, Hernandez N & Schaller H. (1983)  
Signals regulating hepatitis B surface antigen transcrip-  
tion. Nature 305, 336-338

Chakraborty PR, Ruiz-Opazo N, Shouval D & Shafritz DA.  
(1980) Identification of integrated hepatitis B viral DNA  
and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human  
hepatocellular carcinoma cell line. Nature 286, 531-533

Christman JK, Gerber M, Price PM, Flordellis C, Edelman J & Acs G. (1982) Amplification of expression of hepatitis B surface antigen in 3T3 cells cotransfected with a dominant-acting gene and cloned viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1815-1819

Clayton CE & Rigby P. (1981) Cloning and characterization of the integrated viral DNA from three lines of SV40-transformed mouse cells. Cell 25, 547-559

Cohen BJ & Richmond JE. (1982) Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in E. coli. Nature 296, 677-678

Colbere-Garapin F, Chousterman S, Horodniceau F, Kourilsky P & Garapin A-C. (1979) Cloning of the active thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 in Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3755-3759

Colbere-Garapin F, Horodniceau F, Kourilsky P & Garapin AC. (1983) Late transient expression of human hepatitis B virus genes in monkey cells. EMBO J. 2, 21-25

Cummings IW, Browne JK, Salser WA, Tyler GV, Snyder RL Smolec JM & Summers J. (1980) Isolation, characterization and comparison of recombinant DNAs derived from genomes of human hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1842-1846

Dane DS, Cameron CH & Briggs M. (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. Lancet 1970-II, 695-697

Das PK, Nayak NC, Tsignaye KN & Zuckerman AJ. (1980) Establishment of a human hepatocellular carcinoma cell line

releasing hepatitis B virus surface antigen. Br. J. Exp. Path. 61, 648-654

DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR, Scolnick EM & Ellis RW. (1981) Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3328-3332

Dejean A, Brechot C, Tiollais P & Wain-Hobson S. (1983) Characterization of integrated hepatitis B viral DNA cloned from a human hepatoma and the hepatoma-derived cell line PLC/PRF/5. Proc. Natl. Sci. Acad. USA 80, 2505-2509

Delius H, Gough NM, Cameron CH & Murray K. (1983) Structure of the hepatitis B virus genome. J. Virol. 47, 337-343

DeLorbe WJ, Luciw PA, Goodman HM, Varmus HE & Bishop JM. (1980) Molecular cloning and characterization of avian sarcoma virus circular DNA molecules. J. Virol. 36, 50-61

Denhardt DT. (1966) A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-646

Dugaiczky A, Boyer HW & Goodman HM. (1975) Ligation of Eco RI endonuclease generated DNA-fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol. 96, 171-184

Eddleston ALWF, Mondelli M, Mieli-Vergani G & Williams R. (1982) Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 2, 122-127

Edman JC, Gray P, Valenzuela P, Rall LB & Rutter WJ. (1980) Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. Nature 286, 535-538

Edman JC, Hallewall RA, Valenzuela P, Goodman H & Rutter WJ. (1981) Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*. *Nature* 291, 503-506

Eisenburg J. (1982) Die Virus-induzierten Lebererkrankungen beim Menschen. *Naturwissenschaften* 69, 585-593

Ellis RW, DeFeo D, Maryak JM, Young HA, Shih TY, Chang EH, Lowy DR & Scolnick EM. (1981) Dual evolutionary origin for the rat genetic sequences of Harvey murine sarcoma virus. *J. Virol.* 36, 408-420

Folger KR, Wong EA, Wahl G & Capecchi M. (1982) Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1372-1387

Frösner GG, Brodersen M, Papaevangelou G, Sugg U, Haas H, Mushawar IK, Ling C-W, Overby LR & Deinhardt F. (1978) Detection of HBeAg and anti-HBe in acute hepatitis B by a sensitive radioimmunoassay. *J. Med. Virol.* 3, 67-76

Fujiyama A, Miyanochara A, Nazaki C, Yoneyama T, Oktoma N & Matsubara K. (1983) Cloning and structural analysis of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucl. Ac. Res.* 11, 4601-4610

Gahlmann R, Leisten R, Vardimon L & Doerfler W. (1982) Patch homologies and the integration of adenovirus DNA in mammalian cells. *EMBO J.* 1, 1101-1104

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P & Charnay P. (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281, 646-650

Gelmann EP, Petri E, Cetta A & Wong-Staal F. (1982) Deletions of specific regions of the simian sarcoma-associated virus genome are found in defective viruses and in the simian sarcoma virus. *J. Virol.* 41, 593-601

Gerin JL, Purcell RH, Hoggan MD, Holland PV & Chanock RM. (1969) Biophysical properties of Australia antigen. *J. Virol.* 4, 763-768

Gerin JL & Shih JW-K. (1978) Structure of HBsAg and HBcAg. in "Viral Hepatitis" (Vyas GN, Cohen SW & Schmid R., eds.) pp. 147-158 Franklin Institute Press, Philadelphia

Gerin JL, Shih JW-K & Hoyer BH. (1982) Biology and characterization of hepatitis B virus. in "Viral Hepatitis" (Szmuness W, Alter HJ & Maynard JE, eds.) pp. 49-56. Franklin Institute Press, Philadelphia

Gerlich WH & Robinson WS. (1980) Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21, 801-809

Golub ES. (1980) Know thyself: autoreactivity in the immune response. *Cell* 21, 603-604

Goudeau A, Maupas P, Coursaget P, Drucker J, Chiron JP, Denis F & Diop Mar I. (1979) Hepatitis B virus antigens in human primary hepatocellular carcinoma tissues. *Int. J. Cancer* 24, 421-429

Gough N. (1983) Core and e antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNAs. *J. Mol. Biol.* 165, 683-699

Gough N & Murray K. (1982) Expression of the hepatitis B

virus surface, core and e antigen genes by stable rat and mouse cell lines. *J. Mol. Biol.* 162, 43-67

Graham FL & van der Eb AJ. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology* 52, 456-467

Gray P, Edman JC, Valenzuela P & Rutter WJ. (1980) A human hepatoma cell line contains hepatitis B DNA and RNA sequences. in "Animal Virus Genetics" (Fields BN, Jaenisch R & Fox CF., eds.) pp. 281-293 New York: Academic press

Halpern MS, England JM, Deery DT, Petcu DJ, Mason WS & Molnar-Kimber KL. (1983) Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4865-4869

Harris H. (1979) Multilocus enzymes in man. *Ciba Symposium* 66, 187-204

Hayward WS, Neel BG & Astrin SM. (1981) Activation of a cellular onc gene by promotor insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 290, 475-480

Hearing P & Shenk T. (1983) The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell* 33, 695-703

Hiroyuki T, Hidenori H & Takahashi M. (1983) Sequence homology between reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* 305, 827-829

Hirschman SZ, Price P, Garfinkel E, Kristman J & Acs G. (1980) Expression of cloned hepatitis B virus DNA in human

cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5507-5511

Hofschneider PH, Zaslavsky V, Deinhardt F, Frösner GG & Alexander JJ. (1979) Labeling of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) synthesized in a HBsAg-producing hepatoma cell line. J. Med. Virol. 4, 171-175

Hohn B. (1979) In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. Meth. Enzymol. 68, 299-309

Holmes WM, Platt T & Rosenberg M. (1983) Termination of transcription in E.coli. Cell 32, 1029-1032

Jolly DJ, Esty AC, Subramani S, Friedman AT & Verma I. (1983) Elements in the long terminal repeat of murine retroviruses enhance stable transformation by thymidine kinase gene. Nucl. Ac. Res. 11, 1855-1872

Kit S, Dubbs D, Piekarski L & Hsu T. (1963) Deletion of thymidine kinase activity from L cells resistant to bromodeoxyuridine. Exp. Cell. Res. 31, 297-312

Klein G, Bregula U, Wiener F & Harris H. (1971) The analysis of malignancy by cell fusion. J. Cell Science 8, 659-672

Knowles BB, Howe CC & Aden DP. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science 209, 497-499

Koshy R, Koch S, Freytag von Loringhoven A, Kahmann R, Murray K & Hofschneider PH. (1983) Integration of hepatitis B virus DNA: evidence for integration in the single-stranded gap. Cell 34, 215-223

Koshy R, Maupas P, Müller R & Hofschneider PH (1981)

Detection of hepatitis B virus-specific DNA in the genomes of human hepatocellular carcinoma and liver tissues. J. Gen. Virol. 57, 95-102

Khoury G & Gruss P. (1983) Enhancer Elements. Cell 33, 313-314

Lautenberger JA, Schulz RA, Garon CF, Tsichlis PN & Papas TS. (1981) Molecular cloning of avian myeloblastosis virus (MC29) transforming sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1518-1522

Littauer UZ & Soreq H. (1982) The regulatory function of poly(A) and adjacent 3' sequences in translated RNA. in "Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology" Vol. 27, 53-84

London WT & Blumberg BS. (1982) A cellular model of the role of hepatitis B virus in the pathogenesis of primary hepatocellular carcinoma. Hepatology 2, 108-148

MacKay P, Lees J & Murray K. (1981) The conversion of hepatitis B core antigen synthesized in E. coli into e antigen. J. Med. Virol. 8, 237-243

MacKay P, Pasek M, Magazin M, Kovacic RT, Allet B, Stahl S, Gilbert W, Schaller H, Bruce SA & Murray K. (1981) Production of immunologically active surface antigens of hepatitis B virus by Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4510-4514

Macnab GM, Alexander JJ, Lecatsas G, Bey EM & Urbanowicz JM. (1976) Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. Br. J. Cancer 34, 509-515

Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J. (1982) Molecular

cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Maniatis T, Hardison RC, Lacy E, Lauer J, O'Connell C, Quon D, Sim GK & Efstratiadis A. (1978) The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* 15, 687-701

Marion PL, Salazar FH, Alexander JJ & Robinson WS. (1979) Polypeptides of hepatitis B virus surface antigen produced by a hepatoma cell line. *J. Virol.* 32, 796-802

Marquardt OM & Bachmann PA. (1982) Multiple homologies of oligonucleotide size exist between nucleic acids of picornaviruses. *J. Virol.* 64, 643-648

Mason WS, Taylor JM, Seal G & Summers J. (1982) An HBV-like virus of domestic ducks. in "Viral Hepatitis" (Szmuness W, Alter HJ & Maynard JE, eds.) pp. 107-116. Franklin Institute Press, Philadelphia

Maxam A & Gilbert W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzym.* 65, 499-560

Mazzilli MC, Trabace S & Raimondo FD. (1977) HLA and chronic active hepatitis. *Digestion* 15, 278-285

McCoy MS, Toole JJ, Cunningham JM, Chang EH, Lowy DR & Weinberg RA. (1983) Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene. *Nature* 302, 79-81

Meyer zum Büschfelde KH, Manus M & Hutteroth TH. (1980) Liver cell membrane antigens in hepatitis B. in "Virus and the liver" (Bianchi L, Gerok W & Stalder, eds.) Lancaster MTP press Ltd. pp. 105-110

Miller RH & Robinson WS. (1983) Integrated hepatitis B virus DNA sequences specifying the major viral core polypeptide are methylated in PLC/PRF/5 DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2534-2538

Mishiro S, Imai M, Takahashi K, Machida A, Gotanda T, Miyakawa Y & Mayumi M. (1980) A 49,000 dalton polypeptide bearing all antigenic determinants and full immunogenicity of 22 nm hepatitis B surface antigen particles. J. Immunol. 124, 1589-1592

Miyanohara A, Toh-E A, Nozaki C, Hamada F, Oktomo N & Matsubara K. (1983) Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5

Montano L, Miescher GC & Goodall AH. (1982) Hepatitis B virus and HLA antigens display in the liver during chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 2, 56S-60S

Moriarty AM, Hoyer BH, Wai-Kuo Shih J, Gerin JL & Hamer DH. (1981) Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2606-2610

Murray NE, Brammar WJ & Murray K. (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. Mol. Gen. Genetics 150, 53-61

Nakano M, Tohita T & Ando T. (1976) Studies on a protamine (galline) from fowl sperm. Int. Pep. Prot. Res. 8, 565-578

Nusse R & Varmus HE. (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell 31, 99-109

Ogston CW, Jonak GJ, Rogler CE, Astrin SM & Summers J. (1982) Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinomas of woodchucks. *Cell* 29, 385-394

Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y & Nishioka L. (1983) The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucl. Ac. Res.* 11, 1747-1757

Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G & Murray K. (1979) Hepatitis B virus genes and their expression in *E.coli*. *Nature* 282, 575-579

Payet M, Camain R & Pene P. (1956) Le cancer primitif du foi etude critique a propos de 240 ans. *Rev. Intern. d'Hepatol.* 6, 1-86

Perbal B & Baluda MA. (1982) Avian myeloblastosis virus transforming gene is related to unique chicken DNA regions separated by at least one intervening sequence. *J. Virol.* 41, 250-257

Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, Lama C, Fogl J & Wigler M. (1981) Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* 27, 467-476

Peterson DL, Chien DY, Vyas GN, Nitecki D & Bond HE. (1978) Characterization of polypeptides of HBsAg for the proposed "UC vaccine" for hepatitis B. in "Viral Hepatitis" (Vyas GN, Cohen SN & Schmid R., eds.) pp. 569-573, Franklin Institute Press, Philadelphia

Pirovino M, Heer M, Altorfer J, Akovbiantz A, Grob P & Schmid M. (1983) Hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma - pointers to a causal relationship

even in non-endemic Switzerland. Schw. Med. Woch. 113, 824-826

Popper H, Gerber MA & Thung SN. (1982) The relation of hepatocellular carcinoma to infection with hepatitis B and related viruses in man and animals. Hepatology 2, 1-9

Pourcel C, Louise A, Gervais M, Chenciner N, Dubois M-F & Tiollais P. (1982) Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA. J. Virol. 42, 100-105

Pourcel C, Sobzak E, Dubois M-F, Gervais M, Drouet J & Tiollais P. (1982) Antigenicity and immunogenicity of hepatitis B virus particles produced by mouse cells transfected with cloned viral DNA. Virology 121, 175-183

Prince AM. (1968) An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 814-821

Rall LB, Standring DN, Lamb O & Rutter WJ. (1983) Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. Mol. Cell. Biol. 3, 1766-1773

Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C & Berg P. (1977) Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251

Robinson WS, Marion P, Feitelson M & Siddiqui A. (1982) The hepadna virus group: hepatitis B and related viruses. in "Viral Hepatitis" (Szmuness W, Alter HJ & Maynard, eds.) pp. 57-68. Franklin Institute Press, Philadelphia

Romet-Lemonne J-L, McLane MF, Elfassi E, Haseltine WA,

Azocar J & Essex M. (1983) Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastoid cells. *Science* 221, 667-669

Ruiz-Opazo N, Chakraborty PR & Shafritz DA. (1982) Evidence for supercoiled hepatitis B virus DNA in chimpanzee liver and serum Dane particles: possible implications in persistent HBV infection. *Cell* 29, 129-138

Ruley HE. (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304, 602-606

Sambrook J, Greene R, Stringer J, Mitchinson T, Hu S-L & Botchan M. (1979) Analysis of the sites of integration of viral DNA sequences in rat cells transformed by adenovirus 2 or SV 40. in "Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology", Vol. 44, "Viral oncogenes", Cold Spring Harbor Laboratory.

Schaffner W & Weissmann C. (1973) A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* 56, 502-514

Sherr CJ, Fedele LA, Oskarsson M, Maizel J & VandeWoude G. (1980) Molecular cloning of Snyder-Theilen feline leukemia and sarcoma viruses: comparative studies of feline sarcoma virus with its natural helper virus and with moloney murine sarcoma virus. *J. Virol.* 34, 200-212

Siddiqui A. (1983) Hepatitis B virus DNA in Kaposi sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 4861-4864

Skelly J, Copeland JA, Howard CR & Zuckerman AJ. (1979) Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. *Nature London* 282, 617-618

Skelly J, Howard CR & Zuckerman AJ. (1978) The labelling of galactose residues in hepatitis B surface antigen glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 41, 447-457

Snyder RL & Summers J. (1980) Woodchuck hepatitis virus and hepatocellular carcinoma. in "Viruses in naturally occurring cancers" (Essex M, Todaro G & zur Hausen H., eds.) pp. 447-457. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Soberon X, Covarrubias L & Bolivar F. (1980) Construction and characterization of new cloning vehicles. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9, 287-305

Southern E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517

Standring DN, Rall LB, Lamb O & Rutter WJ. (1983) Hepatitis B virus encodes an RNA polymerase III transcript. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1774-1782

Steele RE, Bakken AH & Reeder RH. (1984) Plasmids containing mouse rDNA do not recombine with cellular ribosomal genes when introduced into cultured cells. *Mol. Cell. Biol.* 4, 576-582

Steiner PE & Davis JNP. (1957) Cirrhosis and primary liver carcinoma in Uganda, Africa. *Br. J. Cancer* 11, 523-534

Stibbe W & Gerlich WH. (1982) Variable protein composition of hepatitis B surface antigens from different donors. *Virology* 123, 436-442

Stratowa C, Doehmer J, Wang Y & Hofschneider PH. (1982) Recombinant retroviral DNA yielding high expression of

hepatitis B surface antigen. EMBO J. 1, 1573-1578

Summers J & Mason WS. (1982) Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell 29, 403-415

Summers J, O'Connell A, Maupas P, Goudeau A, Coursaget P & Drucker J. (1978) Hepatitis B virus DNA in primary hepatocellular carcinoma tissue. J. Med. Virol. 2, 207-214

Summers J, O'Connell & Millmann I. (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4597-4601

Szmunness W. (1978) Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: evidence for a causal association. Prog. Med. Virol. 24, 40-51

Thomas HC, Montano L, Goodall A, De Koning R, Oladapo J & Wiedman KH. (1982) Immunological mechanisms in chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 2, 116S-121S

Thomas P. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205

Tiollais P, Charnay P & Vyas GN. (1981) Biology of hepatitis B virus. Science 213, 406-411

Trevisan A, Realdi G & Alberti A. (1982) Core antigen specific immunoglobulin G bound to the liver cell membrane in chronic hepatitis B. Gastroenterology 82, 218-222

Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G & Hall BD. (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface

antigen particles in yeast. *Nature* 298, 347-350

Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, Gray P & Rutter W. (1980) The nucleotide sequence of hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. in "Animal Virus Genetics" (Fields BN, Jaenisch R & Fox CF, eds.) pp. 57-70. New York: Academic Press

Vennström B, Fanshier L, Moscovici C & Bishop JM. (1980) Molecular cloning of the avian erythroblastosis virus genome and recovery of oncogenic virus by transfection of chicken cells. *J. Virol.* 36, 575-585

Wake CT, Gudewicz T, Porter T, White A & Wilson JH. (1984) How damaged is the biologically active subpopulation of transfected DNA? *Mol. Cell. Biol.* 4, 387-398

Wang JYJ & Baltimore D. (1983) Cellular RNA homologous to the abelson murine leukemia virus transforming gene: expression and relationship to the viral sequence. *Mol. Cell. Biol.* 3, 773-779

Wang Y, Schaefer-Ridder M, Stratowa C, Wong T-K & Hofschneider PH. (1982) Expression of hepatitis B surface antigen in unselected cell culture transfected with recircularized HBV DNA. *EMBO J.* 1, 1213-1216

Wang Y, Stratowa C, Schäfer-Ridder M, Doehmer J & Hofschneider PH. (1983) Enhanced production of hepatitis B surface antigen in NIH 3T3 mouse fibroblasts using extrachromasomally replicating bovine papillomavirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1032-1039

Weaver RF & Weissmann C. (1979) Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: the 5' termini of 15 S beta-globin mRNA precursor and mature 10 S beta-globin

mRNA have identical map coordinates. Nucl. Ac. Res. 7, 1175-1193

Wigler M, Silverstein S, Lee L-S, Pellicer A, Cheng Y-c & Axel R. (1977) Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell 11, 223-232

Yoakum GH, Korba BE, Lechner JF, Tokiwa T, Gazdar AF, Seeley T, Siegel M, Leeman L, Autrup H & Harris CC. (1983) High-frequency transfection and cytopathology of the hepatitis B virus core antigen gene in human cells. Science 222, 385-389

## G. ABKÜRZUNGEN

|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| ATP             | Adenosintriphosphat                  |
| bp              | Basenpaare                           |
| cpm             | Impulse pro Minute                   |
| dATP            | 2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat     |
| dCTP            | 2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat      |
| dGTP            | 2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat     |
| DNase           | Desoxyribonuklease                   |
| dTTP            | 2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat     |
| E.              | Einheiten                            |
| <u>E.coli</u>   | <u>Escherichia coli</u>              |
| EDTA            | Ethylendiamintetraazetat             |
| HBV             | Hepatitis B Virus                    |
| kb              | Kilobasenpaare                       |
| mRNA            | Messenger Ribonukleinsäure           |
| MW              | Molekulargewicht                     |
| O.D.            | Optische Dichte                      |
| pfu             | plaque forming units                 |
| <sup>32</sup> P | radioaktives Isotop von Phosphor     |
| RNA             | Ribonukleinsäure                     |
| RNase           | Ribonuklease                         |
| rpm             | Umdrehungen pro Minute               |
| SDS             | Natriumdodecylsulfat                 |
| Tris            | Tris-(hydroxymethyl)-<br>aminomethan |
| w/w             | Gewicht/Gewicht                      |

## H. LEBENSLAUF

Geburtsdatum: 12. 11. 1956  
 Geburtsort: München

## Schulen:

Grundschule, Washington (USA),  
 Heessen, Pech und  
 Bad Godesberg 1962-1966  
 Gymnasium, Pädagogium,  
 Bad Godesberg 1966-1974  
 Abitur 1974

## akademische Ausbildung:

Studium der Philosophie und  
 Germanistik an der  
 Universität Bonn 1974-1975  
 Studium der Chemie an der  
 Universität Bonn 1975-1976  
 Studium der Biochemie an der  
 Universität Berlin 1976  
 Studium der Biochemie an der  
 Oxford University 1976-1980  
 Bachelor of Arts (Oxon) Juni 1980  
 Master of Arts (Oxon) Nov. 1983  
 Doktorarbeit unter Anleitung  
 von Prof. P. H. Hofschneider  
 am Max-Planck-Institut für Okt. 1980 -  
 Biochemie, Martinsried Mai 1984











